

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/12814 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/31, 15/52,
15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 11 日 (11.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/227696 1999 年 8 月 11 日 (11.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,

Yuki) [JP/JP]. 細瀬雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko) [JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒971-8183 福島県いわき市泉町下川字大鋸389-4 三共株式会社内 Fukushima (JP).

(74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

(54) 発明の名称: ML-236B 生合成関連 DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereinto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングされた、該菌内に導入されることにより該菌の ML-236B 生産能を改善することを特徴とする DNA 等を提供する。

本発明の提供する DNA は、ML-236B 生産菌内に導入されることにより、該菌の ML-236B 生産能を改善する。

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日 *Published*
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/12814 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/31, 15/52, 15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420 *filed*
- (22) 国際出願日: 2000 年 8 月 11 日 (11.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平 11/227696 1999 年 8 月 11 日 (11.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,
- Yuki) [JP/JP]. 細瀬雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko) [JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒971-8183 福島県いわき市泉町下川字大廻389-4 三共株式会社内 Fukushima (JP).
- (74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

(54) 発明の名称: ML-236B 生合成関連 DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereinto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングされた、該菌内に導入されることにより該菌の ML-236B 生産能を改善することを特徴とする DNA 等を提供する。

本発明の提供する DNA は、ML-236B 生産菌内に導入されることにより、該菌の ML-236B 生産能を改善する。

WO 01/12814 A1

ID AAF74546 standard; DNA; 34203 BP.
 XX
 AC AAF74546;
 XX
 DT 14-MAY-2001 (first entry)
 XX
 DE Penicillium citrinum ML-236B biosynthesis-associated DNA SEQ ID NO:1.
 XX
 KW Penicillium citrinum; ML-236B biosynthesis; antilipaemic; hyperlipaemia;
 KW HMG-CoA reductase inhibitor; ds.
 XX
 OS Penicillium citrinum.
 XX
 PN WO200112814-A1.
 XX
 PD 22-FEB-2001.
 XX
 PF 11-AUG-2000; 2000WO-JP05420.
 XX
 PR 11-AUG-1999; 99JP-0227696.
 XX
 PA (SANY) SANKYO CO LTD.
 XX
 PI Abe Y, Hosobuchi M, Yoshikawa H;
 XX
 DR WPI; 2001-202868/20.
 XX
 PT New DNA for transfer into a microbial strain to enhance productivity of
 PT the HMG-CoA reductase inhibitor designated ML-236B, for treating
 PT hyperlipemia -
 XX
 PS Claim 1; Page 69-89; 128pp; Japanese.
 XX
 CC The present invention describes a DNA sequence (I) containing a sequence
 CC (S1) of 34203 base pairs (bp) (the present sequence) which can be
 CC transferred into an ML-236B producing strain to improve productivity,
 CC obtained from transformant Escherichia coli pML48 SANK71199 strain
 CC (FERM BP-6780). The modified microorganism is capable of improving its
 CC ML-236B productivity for use as HMG-CoA reductase inhibitor in treating
 CC hyperlipaemia, and can also be used in clarifying the directions and
 CC locations of the 6 structural genes in the DNA. (I) has antilipaemic
 CC activity, and can be used as an HMG-CoA reductase inhibitor.
 XX
 SQ Sequence 34203 BP; 8506 A; 8634 C; 8543 G; 8520 T; 0 other;

Query Match 88.6%; Score 1222; DB 22; Length 34203;
 Best Local Similarity 90.9%; Pred. No. 0;
 Matches 1380; Conservative 0; Mismatches 0; Indels 138; Gaps 2;

Qy 1 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTCGCGCGTTTCGACGCTCA 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33804 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTCGCGCGTTTCGACGCTCA 33745
 Qy 61 TGTGACCGGTGTCATGCACAAAAGCTCAAATGTACCGGTAGCAATGCCAATTTAGTCCGT 120
 : ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33744 TGTGACCGGTGTCATGCACAAAAGCTCAAATGTACCGGTAGCAATGCCAATTTAGTCCGT 33685

41
seq

also in the EP document

appl.

=seq it
 NO: 1
 in mu
 applicatg
 @1007.

in IDS #8

Qy 121 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33684 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 33625

Qy 181 AAGCGCAATTTACATAAAGAAGCCGCGAGCTGGAACACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 240
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33624 AAGCGCAATTTACATAAAGAAGCCGCGAGCTGGAACACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 33565

Qy 241 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 300
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33564 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 33505

Qy 301 TGCTCACCACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 360
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33504 TGCTCACCACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 33445

Qy 361 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTTGATGATCCCGAGTCGTTTCCC 420
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33444 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTTGATGATCCCGAGTCGTTTCCC 33385

Qy 421 GGCGGCTGGCCTCAGCCAAATACATTTGCGGACGATGCCAACAGCAATGAATCTTCGGGG 480
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33384 GGCGGCTGGCCTCAGCCAAATACATTTGCGGACGATGCCAACAGCAATGAATCTTCGGGG 33325

Qy 481 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTTGAAGGCCCTTTGGATGCAACGGCGCCTGTCTCGCCA 540
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33324 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTTGAAGGCCCTTTGGATGCAACGGCGCCTGTCTCGCCA 33265

Qy 541 TCGCTGTTTGACCTCGAAGTAGAGGGGAACCTCGTCATCCGACAATCCAACACAAGCAAC 600
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33264 TCGCTGTTTGACCTCGAAGTAGAGGGGAACCTCGTCATCCGACAATCCAACACAAGCAAC 33205

Qy 601 ACGCAACGAGACCTTTTCGAAAGTCTGTGCGGATGTGTACAGGACCTAGAGGTAATACTC 660
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33204 ACGCAACGAGACCTTTTCGAAAGTCTGTGCGGATGTGTACAGGACCTAGAGGTAATACTC 33145

Qy 661 CACGGGGTGACTGTGGAATGGCCCAAGCAAAAAATTTTAAGCT----- 703
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33144 CACGGGGTGACTGTGGAATGGCCCAAGCAAAAAATTTTAAGCTGTGAGATTTTCAATTCT 33085

Qy 704 -----ACCCGATAGGGGACTTT 720
 ||||||||||||||||||
 Db 33084 GCCTGTTTACTGCCTCTTGATTGTCGCTAAAGCTTCTTCCTAGACCCGATAGGGGACTTT 33025

Qy 721 TTGAATGCCTTTGGTAGATTGCTACTACATCTTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 780
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 33024 TTGAATGCCTTTGGTAGATTGCTACTACATCTTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 32965

Qy 781 AGCAGCATGTTAGATGGGTGTCTGCAAACCAAGAACTTGTTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 840
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 32964 AGCAGCATGTTAGATGGGTGTCTGCAAACCAAGAACTTGTTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 32905

Qy 841 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 900
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Db 32904 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 32845

Qy 901 GCCCAACCTTGTGGACAAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTCAACC 960
 |||
 Db 32844 GCCCAACCTTGTGGACAAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTCAACC 32785

Qy 961 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCACTCCCTCGTTTCACTCTAATCTTCATATC 1020
 |||
 Db 32784 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCACTCCCTCGTTTCACTCTAATCTTCATATC 32725

Qy 1021 GGCGAGCTCATTTACATCTCGACCCATTATGCACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 1080
 |||
 Db 32724 GGCGAGCTCATTTACATCTCGACCCATTATGCACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 32665

Qy 1081 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTTGGGGATAGCACAGGAG 1140
 |||
 Db 32664 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTTGGGGATAGCACAGGAG 32605

Qy 1141 CACGGGGCTGCGGCATCTATTCTGCTA----- 1167
 |||
 Db 32604 CACGGGGCTGCGGCATCTATTCTGCTAGTAAGTGGGACCGATAACCACCAGTCTTTTCTT 32545

Qy 1168 -----GTCCTATCAGATATG 1182
 |||
 Db 32544 CCCTTGCATACATCAGCAATGCGCTGACCGGGAGAGGGGAATAGGTCCTATCAGATATG 32485

Qy 1183 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACCATAACGCCGGCCTCTCGT 1242
 |||
 Db 32484 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACCATAACGCCGGCCTCTCGT 32425

Qy 1243 CTCCTATCTGTGCTTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCCAAGTCAACAAAGGCC 1302
 |||
 Db 32424 CTCCTATCTGTGCTTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCCAAGTCAACAAAGGCC 32365

Qy 1303 TCAGGGAAGACGATAAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTTCGATTAGCGAAG 1362
 |||
 Db 32364 TCAGGGAAGACGATAAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTTCGATTAGCGAAG 32305

Qy 1363 AAACACAATATTGCTTAG 1380
 |||
 Db 32304 AAACACAATATTGCTTAG 32287

明細書

ML-236B 生合成関連DNA

「技術分野」

本発明は、HMG-CoA還元酵素阻害剤ML-236B生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、該DNAとハイブリダイズする核酸分子、該DNAを組み込んだ組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、ML-236Bの製造法、該DNA上の塩基配列に基いて設計されたPCR用プライマー等に関する。

「背景技術」

高脂血症改善薬として臨床において使用されているHMG-CoA還元酵素阻害剤プラバスタチンは、ペニシリウム・シトリナムが生産するML-236Bをストレプトミセス・カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) により微生物変換することにより得られる (Endo, A., et al., J. Antibiot., 29, 1346 (1976) : Matsuoka, S., et al., Eur. J. Biochem., 184, 707 (1989) 記載)。

プラバスタチンの前駆体ML-236B、及び、プラバスタチンと部分構造を共有するHMG-CoA阻害剤ロバスタチンは、ともにポリケチドを経て生合成されることが示されている (Moore, R. N., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 3694 (1985) : Shiao, M. and Don, H. S., Proc. Natl. Sci. Counc. ROC., 11, 223 (1987) 記載)。

ポリケチドとは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低分子カルボン酸残基の連続的な縮合反応から生じる β -ケト炭素鎖から導かれる化合物の総称であり、各 β -ケトカルボニル基の縮合・還元様式により、多様な構造が導かれる (Hopwood, D. A. and Sherman, D. H., Annu. Rev. Genet., 24, 37-66 (1990) : Hutchinson, C. R. and Fujii, I., Annu. Rev. Genet., 49, 201-238 (1995) 記載)。

ポリケチドの合成を担うポリケチド・シンターゼ (Polyketide Synthase : 以下、「PKS」という。) は糸状菌や細菌の有する酵素であることが知られており、糸状菌では該酵素の分子生物学的研究がなされている

(Feng, G. H. and Leonard, T. J., J. Bacteriol., 177, 6246 (1995) : Takano, Y., et al. Mol. Gen. Genet. 249, 162 (1995) 記載)。ロバスタチン生産菌であるアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) については、トリオール P K S 遺伝子の解析がなされている (特表平 9-504436 号公報記載)。

ところで、糸状菌の二次代謝産物の生合成関連遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成していることが少なくない。ポリケチドの生合成系にて、該系に関与する遺伝子クラスターの存在が知られている。アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) の生産するポリケチドであるアフラトキシンの生合成では、P K S その他ポリケチドの生合成に関与する酵素蛋白質をコードする遺伝子がクラスター構造を形成していることが知られており、両菌のアフラトキシシン生合成関連遺伝子のゲノム比較解析が行なわれている (Yu, J., et al, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2365 (1995) 記載)。アスペルギルス・ニジュランズ (*Aspergillus nidulans*) の生産するステリグマトシスチンの生合成においては、生合成関連遺伝子が、ゲノム上の連続する約 60 kb の領域においてクラスター構造を形成していることが報告されている (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載)。

ML-236B 生合成に関する分子生物学的研究は、現在まで十分にはなされていないかった。

「発明の開示」

発明者らは、ペニシリウム・シトリナムの ML-236B 生合成を担う酵素の遺伝子又は遺伝子クラスターを、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングし、得られた組換え DNA ベクターを用いて該生産菌を形質転換することにより、該生産菌において ML-236B の生産性が改善されることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、

(1) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 で示される塩基

配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(2) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、(1) 記載のDNA、

(3) (1) 又は(2) 記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(4) (1) 又は(2) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(5) (1) 乃至(4) のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター、

(6) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、(5) 記載の組換えDNAベクター、

(7) (5) 又は(6) 記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、

(8) ML-236B生産菌であることを特徴とする(7) 記載の宿主細胞、

(9) ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、(8) 記載の宿主細胞、

(10) (8) 又は(9) 記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法、

(11) 大腸菌であることを特徴とする、(7) 記載の宿主細胞、

(12) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、(11) 記載の宿主細胞、

(13) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1、

(14) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA2

(但し、該PCR用プライマーA2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(15) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA3

(但し、該PCR用プライマーA3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(16) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA4

(但し、該PCR用プライマーA4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(17) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号1479のシトシン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーB1、

(18) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と70%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB2

(但し、該PCR用プライマーB2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(19) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と80%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB3

(但し、該PCR用プライマーB3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(20) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と90%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB4

(但し、該PCR用プライマーB4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(21) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号11748のアデニン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーC1、

(22) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC2

(但し、該PCR用プライマーC2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(23) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC3

(但し、該PCR用プライマーC3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

(24) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

(25) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1、

(26) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD2

(但し、該PCR用プライマーD2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(27) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD3

(但し、該PCR用プライマーD3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(28) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD4

(但し、該PCR用プライマーD4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(29) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号11796のアデニン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーE1、

(30) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE2

(但し、該PCR用プライマーE2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(31) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE3

(但し、該PCR用プライマーE3が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(32) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と90%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE4

(但し、該PCR用プライマーE4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(33) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号20723のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーF1、

(34) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF2

(但し、該PCR用プライマーF2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(35) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF3

(但し、該PCR用プライマーF3が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(36) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF4

(但し、該PCR用プライマーF4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(37) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号24321のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーG1、

(38) (37)記載のPCR用プライマーG1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーG2

(但し、該PCR用プライマーG2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番

号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る) 、

(3 9) (3 7) 記載の P C R 用プライマー G 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー G 3

(但し、該 P C R 用プライマー G 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る) 、

(4 0) (3 7) 記載の P C R 用プライマー G 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー G 4

(但し、該 P C R 用プライマー G 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る) 、

(4 1) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 6 3 1 2 のチミン又はそれより 5 ' - 側の塩基を 5 ' - 末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー H 1 、

(4 2) (4 1) 記載の P C R 用プライマー H 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー H 2

(但し、該 P C R 用プライマー H 2 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る) 、

(4 3) (4 1) 記載の P C R 用プライマー H 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー H 3

(但し、該 P C R 用プライマー H 3 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る) 、

(4 4) (4 1) 記載の P C R 用プライマー H 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー H 4

(但し、該 P C R 用プライマー H 4 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番

号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

(4 5) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 3 5 4 5 のアデニン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 1 、

(4 6) (4 5) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 2

(但し、該 PCR 用プライマー I 2 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3 5 4 5 乃至 3 5 4 7 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

(4 7) (4 5) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 3

(但し、該 PCR 用プライマー I 3 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3 5 4 5 乃至 3 5 4 7 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

(4 8) (4 5) 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 4

(但し、該 PCR 用プライマー I 4 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3 5 4 5 乃至 3 5 4 7 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

(4 9) 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 2 8 4 7 2 のチミン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 1 、

(5 0) (4 9) 記載の PCR 用プライマー J 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 2

(但し、該 PCR 用プライマー J 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 5 7 2 7 乃至 5 7 2 9 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

(51) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ3

(但し、該PCR用プライマーJ3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(52) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ4

(但し、該PCR用プライマーJ4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(53) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号400のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK1、

(54) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK2

(但し、該PCR用プライマーK2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(55) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK3

(但し、該PCR用プライマーK3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(56) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK4

(但し、該PCR用プライマーK4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(57) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号32287のシトシン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL1、

(58) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL2

(但し、該PCR用プライマーL2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(59) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL3

(但し、該PCR用プライマーL3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、及び、

(60) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL4

(但し、該PCR用プライマーL4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、
に関する。

本発明は、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とする、該生産菌のゲノムに由来するDNA(以下、「ML-236B生合成関連DNA」という。)等に関する。

本発明において、ML-236B生産菌とは、ML-236B生産能を先天的に有する微生物をいう。ML-236B生産菌としては、例えば、ペニシリウム(Penicillium)属に属するML-236B生産菌が挙げられ、ペニシリウム・シトリナム、ペニシリウム・ブレビコンパクトム(Penicilium brevicompactum: Brown, A. G., et al., J. Chem. Soc. Perkin-1., 1165(1976)記載)、ペニシリウム・シクロピウム(Penicillium cyclopium: Doss, S. L., et al., J. Natl. Prod.,

49,357(1986)記載)等が例示される。さらに、これら以外に、ユーペニシリウム・エスピー M6603 (Eupenicillium sp. M6603: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ペシロミセス・ビリディス FERM P-6236 (Paecilomyces viridis FERM P-6236: 特開昭58-98092号公報記載)、ペシロミセス・エスピー M2016 (Paecilomyces sp. M2016: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、トリコデルマ・ロンギブラチアタム M6735 (Trichoderma longibrachiatum M6735: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ヒポミセス・クリソスペルムス IFO 7798 (Hypomyces chrysospermus IFO 7798: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、グリオクラディウム・エスピー YJ-9515 (Gliocladium sp. YJ-9515: WO 9806867号公報記載)、トリコデルマ・ビリデ IFO 5836 (Trichoderma viride IFO 5836: 特公昭62-1915号公報記載)、ユーペニシリウム・レチクリスポルム IFO 9022 (Eupenicillium reticulisporum IFO 9022: 特公昭62-19159号公報記載)等が挙げられる。これらのML-236B生産菌のうち、好適にはペニシリウム・シトリナムであり、より好適にはペニシリウム・シトリナム SANK 13380株である。ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株は、平成4年(1992年)12月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-4129を付された。

ML-236B生合成関連DNAは、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーに対して、類似の機能を有するものと推測される糸状菌由来のDNAの塩基配列に基いて設計されるプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより得られる。

ゲノムDNAライブラリーの作成法としては、通常真核生物のゲノムDNAライブラリーを作製するための方法であれば特に限定されないが、例えば、マニァティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)記

載)等が挙げられる。

ML-236B生産菌のゲノムDNAは、該生産菌培養物から菌体を回収して物理的に破碎した後、核内DNAを抽出、精製することにより得られる。

ML-236B生産菌の培養は、各ML-236B生産菌に適した条件下で行なうことができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌体を培養したスラントから、MBG3-8培地(組成; 7%(w/v)グリセリン、3%(w/v)グルコース、1%(w/v)大豆粉、1%(w/v)ペプトン(極東製薬工業(株)製)、1%(w/v)コーンステープリカー(ホーネンコーポレーション(株)製)、0.5%(w/v)硝酸ナトリウム、0.1%(w/v)硫酸マグネシウム七水和物、pH6.5)へ該菌体を接種し、22乃至28℃、3乃至7日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。該スラントは、溶解させたPGA寒天培地(組成; 200g/L馬鈴薯抽出液、15%(w/v)グリセリン、2%(w/v)寒天)を試験管に注ぎ、傾斜させつつ固化させたものに、白金耳を用いてペニシリウム・シトリナムを接種し、22乃至28℃、7乃至15日保温することにより作製する。該スラントを0乃至4℃で保存することにより、該スラント上で該菌を継続的に生存させることができる。

液体培地で培養したML-236B生産菌の菌体は、遠心分離により、固体培地で培養した該菌の菌体は、セル・スクレーパー等のかきとることにより、それぞれ回収することができる。

菌体の物理的破碎は、菌体を液体窒素等で凍結しつつ乳鉢と乳棒ですり潰すことにより行なうことができる。破碎された菌体の核内DNAの抽出は、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulphate: 以下、「SDS」という。)等の界面活性剤を用いて行なうことができる。抽出されたゲノムDNAは、フェノール・クロロホルム抽出を行なうことにより除タンパクされ、エタノール沈澱を行なうことにより沈澱として回収することができる。

得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で限定分解させ、断片化する。限定分解に使用される制限酵素としては、通常入手可能な制限酵素であれば特に限定されないが、例えば、Sau3AI等を挙げることができる。断片化されたDNA

をゲル電気泳動に供し、適当なサイズのゲノムDNAを含むゲルからDNAを回収する。DNA断片のサイズには特に限定はないが、好適には20 kb以上である。

ゲノムDNAライブラリー作製のDNAベクターとしては、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、BACベクター等が挙げられ、好適にはコスミドベクターである。また、これらDNAベクターは発現ベクターであってもよい。さらに、該DNAベクターは、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞に表現形質（表現型；Phenotype）の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該DNAベクターは、クローニング及び機能発現の双方に適用できるものであることが好ましい。該DNAベクターとしては、複数の微生物群に形質転換可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。該シャトルベクターは、少なくとも一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有する。また、シャトルベクターは複数の微生物群の宿主にそれぞれ表現形質の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該シャトルベクターにより形質転換される微生物群の組合わせとしては、一方の微生物群がクローニングに適用でき且つ他方がML-236B生産能を有していれば特に限定されないが、例えば、細菌及び糸状菌の組合わせ、酵母及び糸状菌の組合わせ等が挙げられ、好適には細菌及び糸状菌の組合わせである。細菌としては、通常遺伝子工学に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌等を挙げることができ、好適には大腸菌であり、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株である。酵母としては、通常遺伝子工学に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）等を挙げるができる。糸状菌としては、上述のML-236B生産菌等が挙げられる。なお、本発明において微生物群は、細菌、糸状菌及び酵母から選択される。

このようなシャトルベクターとしては、例えば、適当な表現型選択マーカー遺伝子及びコス（cos）部位を有するコスミドベクター等を挙げることができ、好適には大腸菌ハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子配列を有するプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）にコスミドベクターpWE15（STRATAGENE社製）の有するコス（cos）部位を挿入して作製されたpSAKcos1が挙げられるが、これらに限定されない。pSAKcos1の構築手順については図1に記載されている。

上述のML-236B生産菌ゲノムDNA断片をライゲーションしたシャトルベクターを宿主細胞に導入することにより、所望のゲノムDNAライブラリーが完成する。宿主細胞には、好適には大腸菌、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株がそれぞれ使用される。宿主細胞が大腸菌の場合、該導入はin vitroパッケージングにより行なう。本発明において、形質転換とは、in vitroパッケージングによる外来DNAの導入も意味し、in vitroパッケージングにより外来DNAを導入された細胞も形質転換細胞の意味に包含される。

所望のクローンのスクリーニングには、抗体又は核酸プローブを用い、好適には、核酸プローブを用いる。該核酸プローブは、糸状菌のポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて作製することができる。このような遺伝子としては、ポリケチドの生合成への関与が確認され且つ塩基配列が公知のものであれば特に限定されないが、例えば、アスペルギルス・フラヴァス（*Aspergillus flavus*）及びアスペルギルス・パラシティカス（*Aspergillus parasiticus*）のアフラトキシンPKS遺伝子、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）のストリグマトシスチンPKS遺伝子等を挙げることができる。

該核酸プローブは、上述の公知の塩基配列に基づいて、ゲノムDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプローブの合成により、またオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、ゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：以下、「PCR」という。：Saiki, R. K., et al., Science, 239, 487 (1988) 記載）を行なうことにより、

又は、mRNAを鋳型として、逆転写酵素 (reverse transcriptase) でcDNAを合成した後、PCRを行なう方法 (逆転写PCR: reverse transcription-PCR: 以下、「RT-PCR」という。) 等により、取得することができる。

核酸プローブのML-236B生産菌からのPCR又はRT-PCRによる取得方法は、以下の通りである。PCR又はRT-PCRに使用するプライマー (以下、「PCR用プライマー」という。) の設計は、塩基配列が公知であるところのポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて、好適にはアスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシシンPKS遺伝子又はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。これらのうちいずれか一つのPKSのアミノ酸配列上で種間保存性の高いアミノ酸配列を塩基配列に還元することにより、PCR用プライマーを設計することができる。アミノ酸配列から塩基配列に還元する方法としては、宿主のコドン使用頻度を考慮して単一の配列を導く方法又は多重コドンを使用して混合配列 (以下、「ミックス・プライマー」という。) を導く方法の二通りが使用できる。後者の場合、塩基配列にヒポキサンチンを含むさせることにより多重度を下げることができる。

また、PCR用プライマーには、鋳型鎖とアニーリングするための塩基配列に加え、該プライマーの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

さらに、PCR用プライマーの設計においては、グアニン塩基の数とシトシン塩基の数の和が総塩基数の40乃至60%であることが好ましい。また、自己アニーリングし難いことが好ましい。一組のPCR用プライマーにおいては、双方のPCR用プライマー同士がアニーリングし難いことが好ましい。

また、PCR用プライマーの塩基数は、PCRに適用できれば特に限定されないが、その範囲の下限は10乃至14、上限は40乃至60であり、好適な範囲は14乃至40である。

さらに、PCR用プライマーは、好適にはDNAである。該プライマーを構成するヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジン及びグアノシンに加え、デオキシイノシン、イノシン等が挙げられる。

また、PCR用プライマーの5'-末端に位置するヌクレオシドの5'-位は、水酸基であるか、又は、該水酸基に一リン酸がエステル結合した状態である。

さらに、PCR用プライマーの合成は、通常核酸の合成に使用される方法、例えば、ホスフォロアミダイト法により行なうことができ、このような方法には、DNA自動合成機が好適に使用される。

PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のゲノムDNAが、RT-PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のmRNAが、それぞれ使用できる。なお、RT-PCRの鋳型としては、mRNAの代わりに全RNAを使用することも可能である。

PCR産物又はRT-PCR産物をこのものに適したDNAベクターに組込むことにより、該PCR産物又はRT-PCR産物をクローニングすることができる。該クローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。また、PCR産物又はRT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。)が好適に使用される。

クローニングしたPCR産物の取得は、所望のPCR産物を含んでいることを確認した形質転換宿主細胞を培養し、該細胞からプラスミドを抽出、精製し、得られたプラスミドから挿入DNA断片を回収することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができる。

好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB培地（1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム）で、30乃至37℃、18時間乃至2日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養物からのプラスミドの調製は、該宿主細胞の菌体を回収し、ゲノムDNAやタンパク質を除去することによりなされる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養物からのプラスミドの調製は、マニアティスらのアルカリ法（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 記載）により行なうことができる。また、より純度の高いプラスミドを得るためのキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Mini Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。さらに、プラスミドの大量調製を行うキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Maxi Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。

得られたプラスミドのDNA濃度は、DNA試料を適宜希釈して波長260 nmにおける吸光度を測定し、吸光度1 = DNA 50 μ g/mlとして算出することができる。DNAの純度は、波長280及び260 nmの吸光度の比率から算出することができる。

核酸プローブの標識は、放射性標識及び非放射性標識に大別される。放射性標識に使用される放射性核種としては、通常使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 等を挙げることができ、好適には ^{32}P である。非放射性標識に用いる試薬としては、通常核酸の標識に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、ジゴキシゲニン、ビオチン等が挙げられ、好適にはジゴキシゲニンである。核酸プローブを標識する方法としては、通常使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、標識基質を用いたPCRにより該産物中に取り込ませる方法、ニック・トランスレーション法、ランダム・プライマー法、末端標識法、標識基質を用いてオリゴDNAを合成する方法等を挙げることができ、核酸プローブの種類等によりこれらの方法から適宜選択でき

る。

核酸プローブの塩基配列がML-236B生産菌のゲノム中に存在することは、該生産菌のゲノムDNAを用いたサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより確認することができる。

サザンブロット・ハイブリダイゼーションは、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 記載) により行なうことができる。

上述の通り作製された標識核酸プローブを用い、ゲノムDNAライブラリーから目的クローンをスクリーニングすることができる。該スクリーニング法としては、通常遺伝子クローニングに使用される方法であれば特に限定されないが、好適にはコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 記載) を使用することができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションに用いるコロニーの培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができ、好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB寒天培地 (1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム、1.5% (w/v) アガロース) 上で、30乃至37℃、18時間乃至2日間保温することにより行なうことができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションにより得られる陽性クローンからの組換えDNAベクターの調製は、該陽性クローンの培養物からプラスミドを抽出及び精製することによりなされる。

本発明において得られた陽性クローンである形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株は、平成11年(1999年)7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1-1-3)に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。*E. coli* pML48 SANK71199株が保持する組換えDNAベクターはpML48と命名された。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターが所望のML-236B生合成関連DNAを含んでいることは、該組換えDNAベクターの挿入塩基配列の決定、サザンブロット・ハイブリダイゼーション又は機能発現により確認できる。

DNAの塩基配列は、マキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980) 記載) 又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982) 記載) 等により決定できる。なお、塩基配列決定に供するプラスミドDNAとしては、より純度の高い標品が好ましい。

pML48の挿入塩基配列は配列表の配列番号1に示される。配列表の配列番号2に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列に対して完全に相補的である。通常ゲノムDNAの塩基配列は同種内において遺伝的多型 (ポリモルフィズム: polymorphism) を有している。また、DNAクローニングの過程及び塩基配列決定の過程において、ヌクレオチドの置換等が一定の確率で生じ得る。従って、本発明は、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするML-236B生合成関連DNA、及び配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするML-236B生合成関連DNAをも包含する。これらDNAとしては、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列に1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加が生じたもの、並びにペニシリウム・シトリナム SANK13380株以外のML-236B生産菌に由来するものであり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善する機能を有するものをも包含する。なお、本発明において、ハイブリダイズとは、2本の一本鎖核酸同士が互いに相補的な領域又は相補性の高い領域において二本鎖を形成することをいい、ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション液の組成が6×SSC (1×SSCの組成は、150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム。) であり且つハイブリダイゼーションを行なう際の保温温度が55℃の場合

をいう。

ML-236B 生合成関連DNAの解析法は次の1)乃至3)に従う。

1) 遺伝子解析ソフトによる解析

ゲノムDNA配列中の遺伝子領域の推定は、既存の遺伝子解析プログラム (Gene Finding プログラム (以下、「GRAIL」という。))、及び配列の相同性検索プログラム (BLASTN及びBLASTX) により行うことができる。

GRAILはゲノム配列の「遺伝子配列らしさ」を評価する7つのパラメータに分割し、それらの結果をニューラルネット法を用いて統合することにより、ゲノムDNA上の構造遺伝子を検索するプログラム (Uberbacher, E. C. & Mural, R. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 11261 (1991) 記載) であり、Apocoma GRAIL Toolkit (APOCOM社製) が好適に使用される。

BLASTは核酸配列及びアミノ酸配列の相同性検索を行なうアルゴリズム (Altechul, S. F., Madden, T. L., et al., Nucl. Acids Res., 25, 3389 (1997) 記載) を用いたプログラムである。

ゲノムDNA配列を適当な長さに分割し、BLASTNを用いて遺伝子データベースに対し相同性検索することにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向を推定することができる。また、分割されたゲノムDNA配列を6つの翻訳フレーム (センス配列及びアンチセンス配列に各々3つずつ) に従ってアミノ酸配列に翻訳し、該アミノ酸配列のペプチド・データベースに対する相同性検索をBLASTXを用いて行なうことにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向の推定を行なうこともできる。さらに、真核生物においては、ゲノムDNA配列中に含まれる構造遺伝子のコード領域がイントロン配列により分断されている場合があり、このようなギャップを有する構造遺伝子の解析にはギャップ含有配列用のBLASTがより有効であり、Gapped-BLAST (BLAST2: WISCONSIN GCG package ver. 10.0に搭載) が好適に使用される。

2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法による解析

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法により、1) 記載の解析法により推定される構造遺伝子の発現を調べることができる。

ノーザンブロットに供するML-236B生産菌の全RNAは、該菌の培養物より得ることができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌のスラントからMGB3-8培地に該菌を接種し、22乃至28℃、1乃至4日間、振盪しつつ保温することにより行うことができる。

ML-236B生産菌からのRNAの抽出は、通常全RNAを調製するのに使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホットフェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられる。また、より純度の高い全RNAを調製するための市販キットとしては、例えば、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製)等が挙げられる。さらに、mRNAは、全RNAをオリゴ(dT)カラムに添加し、該カラムに吸着した画分を回収することにより得ることができる。

RNAのメンブレンへのトランスファー、プローブの調製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、上述のサザンブロット・ハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる。

3) 5'-末端及び3'-末端の解析

各構造遺伝子の5'-末端及び3'-末端の解析は、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により行なうことができる。RACEは、mRNAを鋳型とし、塩基配列が決定されている領域から塩基配列が決定されていない5'-末端又は3'-末端領域までを含むcDNAを、RT-PCRの応用により取得する方法である (Frohman, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 8998 (1988) 記載)。

5' RACEは以下の方法に従う。mRNAを鋳型とし、塩基配列中の公知の部分に基づいて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA (1) をプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼにより該cDNA第一鎖の3'-末端にホモポリメリックな (homopolymeric: 単一塩基からなる) ヌクレオチド鎖

を付加させる。該cDNA第一鎖を鋳型とし且つ該ホモポリメリックな塩基配列に相補的な塩基配列を含むセンス側のオリゴDNA、及び、アンチセンス側に存在し且つオリゴDNA (1) より3' -側が存在するオリゴDNA (2) をプライマーとしたPCRによって、5' -末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である (Frohman, M. A., Methods in Enzymol., 218, 340 (1993) 記載)。5' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Version 2.0 (GIBCO社製) 等が好適に使用される。

3' RACEは、mRNAの3' -末端に存在するポリA領域を利用する方法である。すなわち、mRNAを鋳型として、オリゴd(T) アダプターをプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、該cDNA第一鎖を鋳型として、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたセンス側のオリゴDNA (3)、及び、アンチセンス側のオリゴd(T) アダプターをプライマーとしたPCRによって、3' -末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である。3' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit (Pharmacia社製) が好適に使用される。

RACEにおける塩基配列中の公知の部分に基いたプライマーの設計には、上記1) 及び2) の解析結果が好適に利用できる。

以上、1) 乃至3) に記載した解析法により、ゲノムDNA配列上の構造遺伝子の方向、並びに、構造遺伝子中の転写開始点の位置、翻訳開始コドンの位置、翻訳終止コドン及びその位置を推定することができる。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子及びそのcDNAを取得することが可能である。

本発明において得られた組換えDNAベクター pML48挿入配列上には、6つの構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをm1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cRと命名した。このうち、m1cA、m1cB、m1cE及びm1cRは配列表の配列番号2に示される塩基配列上にコード領域

を有し、m l c C及びm l c Dは配列表の配列番号1に示される塩基配列上にコード領域を有しているものと推定された。

c DNAの取得法としては、上述の情報に基づいて設計され得るプライマーを用いたR T-P C Rによるクローニング、かかる情報に基づいて得られるDNAプローブを用いたc DNAライブラリーからのクローニング等が挙げられる。

これらの方法で取得できるc DNAを機能発現させるためには、完全長のc DNAを得る必要がある。また、R T-P C Rにより機能発現し得るc DNAを取得するためには、該R T-P C R産物が本来の位置に翻訳開始コドンを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないようにプライマーを設計することが必須である。

P C R用プライマーX 1 (XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択され、A 1は(1 3)、C 1は(2 1)、E 1は(2 9)、G 1は(3 7)、I 1は(4 5)、K 1は(5 3)に記載されている。)又はP C R用プライマーY 1 (YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択され、B 1は(1 7)、D 1は(2 5)、F 1は(3 3)、H 1は(4 1)、J 1は(4 9)、L 1は(5 7)に記載されている。)は配列表の配列番号1又は配列番号2に示される塩基配列中の少なくとも10個の塩基からなる塩基配列を有する。

P C R用プライマーの有する塩基配列は、鋳型鎖と選択的にアニーリングし且つP C R又はR T-P C Rのプライマーとして機能し得る限りにおいては、該鋳型鎖の一部と完全に相補的でなくてもよい。

P C R用プライマーX 2乃至X 4 (XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択され、A 2は(1 4)、A 3は(1 5)、A 4は(1 6)、C 2は(2 2)、C 3は(2 3)、C 4は(2 4)、E 2は(3 0)、E 3は(3 1)、E 4(3 2)、G 2は(3 8)、G 3は(3 9)、G 4は(4 0)、I 2は(4 6)、I 3は(4 7)、I 4は(4 8)、K 2は(5 4)、K 3は(5 5)、K 4は(5 6)に記載されている。)はP C R用プライマーX 1 (X 1及びX 2乃至X 4のXは同じアルファベットのグループを表わす; A 1にはA 2乃至A 4、C 1にはC 2乃至C 4、E 1にはE 2乃至E 4、G 1にはG 2乃至G 4、I 1に

はI 2乃至I 4、K 1にはK 2乃至K 4が、それぞれ対応する。)の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーY 2乃至Y 4 (YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択され、B 2は(18)、B 3は(19)、B 4は(20)、D 2は(26)、D 3は(27)、D 4は(28)、F 2は(34)、F 3は(35)、F 4は(36)、H 2は(42)、H 3は(43)、H 4は(44)、J 2は(50)、J 3は(51)、J 4は(52)、L 2は(58)、L 3は(59)、L 4は(60)に記載されている。)はPCR用プライマーY 1 (Y 1及びY 2乃至Y 4のYは同じアルファベットのグループを表わす; B 1にはB 2乃至B 4、D 1にはD 2乃至D 4、F 1にはF 2乃至F 4、H 1にはH 2乃至H 4、J 1にはJ 2乃至J 4、L 1にはL 2乃至L 4が、それぞれ対応する。)の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーX 1乃至X 4 (XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択される。)のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4 (YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択される。)のいずれか一つをプライマーとしてPCR又はRT-PCRを行なうことができる。

上述の通り、本発明において得られた組換えDNAベクター pML 4 8挿入配列上には、6つの構造遺伝子(m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cR)の存在が推定された。これらの6つの構造遺伝子のcDNAは、逆転写反応並びに該PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つによるPCRを組み合わせたRT-PCRにより取得することができる。また、各構造遺伝子は、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとし、ML-236B生産菌のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより取得することができる。

完全長であり且つ適当な宿主細胞において発現し得るcDNAを取得するため

のPCR用プライマーとしては、次の①において述べる、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

① m l c AのcDNAの取得には、PCR用プライマーA 1乃至A 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーB 1乃至B 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c BのcDNAの取得には、PCR用プライマーC 1乃至C 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーD 1乃至D 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c CのcDNAの取得には、PCR用プライマーE 1乃至E 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーF 1乃至F 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c DのcDNAの取得には、PCR用プライマーG 1乃至G 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーH 1乃至H 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c EのcDNAの取得には、PCR用プライマーI 1乃至I 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーJ 1乃至J 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c RのcDNAの取得には、PCR用プライマーK 1乃至K 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーL 1乃至L 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

さらに、PCR用プライマーX 1乃至X 4には以下の②の要件が伴う。

② PCR用プライマーX 1乃至X 4は、該PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとしたPCR産物が本来の位置に翻訳開始コドンa t gを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないように設計される（なお、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至3 4 2 0 3に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至3

4 2 0 3に示される塩基配列における、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳開始コドンの位置は、表4に記載されている）。

P C R用プライマーX 1はc D N Aの翻訳開始コドンa t g中のa又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする。

P C R用プライマーX 2乃至X 4は配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至3 4 2 0 3に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至3 4 2 0 3に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする（配列表の配列番号2の全塩基配列は、配列表の配列番号1の全塩基配列に対して完全に相補的である。）。

P C R用プライマーX 2乃至X 4が翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列を含む場合、翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列上に開始コドンa t gから始まる翻訳フレーム中に終始コドンとなるような塩基配列（t a a、t a g又はt g a）は含まれない。なお、開始コドンa t gから始まる翻訳フレームとは、翻訳開始コドンa t gより3' -側の塩基配列を翻訳開始コドンa t gから3塩基単位に分割したときに生じる3塩基からなる配列をいう。

P C R用プライマーX 2乃至X 4が、翻訳開始コドンのa、a t又はa t g（「塩基又は塩基配列m」という。）にその位置で対応する塩基又は塩基配列（「塩基又は塩基配列m'」という。）を含む場合、塩基又は塩基配列mがaのとき、塩基又は塩基配列m'はaであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のaは、該P C R用プライマーX 2乃至X 4の3' -末端に位置する。塩基又は塩基配列mがa tのとき、塩基又は塩基配列m'はa tであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のa tは、該P C R用プライマーX 2乃至X 4の3' -末端に位置する。塩基又は塩基配列mがa t gのとき、塩基又は塩基配列m'はa t gであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のa t g中のaを1番目として3' -方向に数えて3 × n + 1（nは1以上の整数）番目のヌクレオチドを5' -末端とするトリヌクレオチドが該P C R用プライマーX 2乃至X 4に存在する場合、該トリヌクレオチドの塩基配列がt a a、t a g及びt g aのいずれかであることはない。

P C R用プライマーX 2乃至X 4の3' -末端が、翻訳開始コドンa t g中の

a を 1 番目として 3' - 方向に数えて $3 \times n + 1$ (n は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該 PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 を一方のプライマーとし、ML-236B 生産菌の RNA 若しくは mRNA を鋳型とする RT-PCR 産物又はゲノム DNA 若しくは cDNA を鋳型とする PCR 産物において、 $3 \times n + 1$ 番目のヌクレオチド及びその 3' - 側に隣接するジヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 のいずれか一つの 3' - 末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a を 1 番目として 3' - 方向に数えて $3 \times n + 2$ (n は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該 PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 を一方のプライマーとし、ML-236B 生産菌の RNA 若しくは mRNA を鋳型とする RT-PCR 産物又はゲノム DNA 若しくは cDNA を鋳型とする PCR 産物において、 $3 \times n + 2$ 番目のヌクレオチド及びその 3' - 側並びに 5' - 側に隣接する 2 つのモノヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 の 3' - 末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a を 1 番目として 3' - 方向に数えて $3 \times n + 3$ (n は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、 $3 \times n + 1$ 乃至 $3 \times n + 3$ 番目のヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

以上が②の要件である。

また、PCR 用プライマー Y 1 乃至 Y 4 には以下の③の要件が伴う。

③ PCR 用プライマー Y 1 乃至 Y 4 は、PCR 用プライマー X 1 乃至 X 4 のいずれか一つ及び該 Y 1 乃至 Y 4 のいずれか一つをプライマーとする PCR により、各構造遺伝子 (m l c A、m l c B、m l c C、m l c D、m l c E 及び m l c R) にコードされるペプチドの N 末端から C 末端までをコードした cDNA を増幅できるように設計される。

PCR 用プライマー Y 1 は、cDNA 上の翻訳終止領域附近の塩基配列に対し

て相補的な塩基配列を有するPCR用プライマーであれば特に限定されないが、好適には翻訳終止コドンの3'-末端の塩基に対して相補的な塩基又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする塩基配列を有し、より好適には翻訳終止コドンに対して相補的な3塩基の配列を有する（なお、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳終止コドン、該翻訳終止コドンの相補配列、各構造遺伝子にコードされるペプチドのC末端のアミノ酸残基、該アミノ酸残基をコードした塩基配列、並びに、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列におけるそれらの位置は、表8乃至10に記載されている）。

PCR用プライマーY2乃至Y4は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする。

以上が③の要件である。

さらに、PCR用プライマーX2乃至X4及びPCR用プライマーY2乃至Y4は、上述の定義及び②及び③記載の要件を満たす限りにおいて、それぞれの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

また、PCR用プライマーX1乃至X4及びPCR用プライマーY1乃至Y4の設計は、前述のPCR用プライマーの設計に関する記述に従って行なう。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターの機能発現は、該組換えDNAベクターで細胞を形質転換し、該形質転換細胞のML-236B生産能を測定することにより行なうことができる。機能発現を行なう細胞としては、上述のML-236B生産菌又はML-236B非生産菌を用いることができる。ML-236B非生産菌としては、該DNAベクターで形質転換される細胞であれば特に

限定されないが、例えば、上述のML-236B生産菌の非生産変異株等が挙げられる。該変異株に形質転換することによりML-236Bの生産が回復すれば、該組換えDNAベクターが所望の機能を有すると推定することができる。

機能発現のための形質転換法は、宿主細胞に依存して適宜選択される。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ペニシリウム・シトリナムの孢子からプロトプラストを調製し、該プロトプラストに組換えDNAベクターを導入することにより行なうことができる (Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載)。

プロトプラストの調製は以下の方法による。

ペニシリウム・シトリナムを培養したスラントからPGA寒天培地のプレートへ該菌を接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、該プレートから孢子を回収し、該孢子 1×10^7 乃至 1×10^9 個を50乃至100mlのYPL-20培地 (組成; 0.1% (w/v) イーストエキストラクト (Difco社製)、0.5% (w/v) ポリペプトン (日本製薬 (株) 製)、20% (w/v) ラクトース、pH 5.0) に接種し、22乃至28℃、18時間乃至2日間保温する。該培養物から発芽孢子を回収し、細胞壁分解酵素で処理し、プロトプラストを得る。細胞壁分解酵素としては、ペニシリウム・シトリナムの細胞壁を分解するものであり且つ該菌に有害な作用を及ぼさないものであれば特に限定されないが、例えば、ザイモリアーゼ、キチナーゼ等が挙げられる。

形質転換されたML-236B生産菌の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができるが、好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換体の場合は、ML-236Bを生産させる前に、形質転換された該菌のプロトプラストを適当な条件下で培養することにより予め細胞壁を再生させておく。

該細胞壁の再生は、形質転換したペニシリウム・シトリナムのプロトプラストを封入したVGS中層寒天培地 (組成; Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2% (w/v) 寒天) をVGS下層寒天培地 (組成; Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2.7% (w/v) 寒

天) 及びVGS上層寒天培地(組成: Vogel最小培地、2%(w/v)グルコース、1Mグルシトール、1.5%(w/v)寒天)で挟み、22乃至28℃、7乃至15日間保温することにより行なうことができる。得られた菌株はPGA培地上で、22乃至28℃で保温しつつ継代培養する。該菌株をPGA培地で作製したスラントに白金耳を用いて接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、0乃至4℃で保存する。

上述の通り細胞壁を再生させたペニシリウム・シトリナムの形質転換体を培養したスラントから、MBG3-8培地へ該形質転換体を接種し、22乃至28℃、7乃至12日間、振盪しつつ保温することにより、ML-236Bを効率よく生産することができる。なお、宿主細胞のペニシリウム・シトリナムについても、全く同様の液体培養によりML-236Bを生産させることができる。

ML-236B生産菌の培養物からのML-236Bの精製は、通常天然物の精製に使用される諸技法を組み合わせることによりなされる。該諸技法としては、特に限定されないが、例えば、遠心分離、濾過による固液分離、アルカリ又は酸処理、有機溶媒による抽出、転溶、吸着及び分配等の各種クロマトグラフィー、結晶化等が挙げられる。ML-236Bは、ヒドロキシ酸体とラクトン体の両方の形をとり、相互に変換し、更に、ヒドロキシ酸体は安定な塩を形成する。このような物理化学的特質を利用して、ML-236Bのヒドロキシ酸体(以下、「遊離型ヒドロキシ酸」という。)、ML-236Bのヒドロキシ酸塩(以下、「ヒドロキシ酸塩」という。)、又はML-236Bのラクトン体(以下、「ラクトン」という。)を得ることができる。

該培養物を、加熱下又は常温下でアルカリ加水分解することにより開環し、ヒドロキシ酸塩に変換し、該反応溶液を酸性にした後濾過し、濾液を水と混和しない有機溶媒で抽出することにより、目的化合物を遊離型ヒドロキシ酸として得ることができる。水と混和しない有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、メチレンクロリド、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、蟻酸エチル、酢酸エチル等のエステル類、

それら2種以上の混合溶媒等が挙げられる。

また、この遊離型ヒドロキシ酸を、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属塩類の水溶液に転溶することにより、目的化合物をヒドロキシ酸塩として得ることができる。

さらに、この遊離型ヒドロキシ酸を、有機溶媒中で加熱して脱水するか、又は他の方法により閉環することにより、目的化合物をラクトンとして得ることができる。

このようにして得ることができる遊離型ヒドロキシ酸、ヒドロキシ酸塩及びラクトンは、カラムクロマトグラフィー等により精製、単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーの担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、セファデックス LH-20 (Pharmacia社製)、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学(株)製)、シリカゲル、逆相系担体等が挙げられ、好適にはC18系の担体である。

ML-236Bの定量法としては、通常有機化合物の定量に用いられる方法であれば特に限定されないが、例えば、逆相高性能クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography: 以下、「逆相HPLC」という。) 法等が挙げられる。逆相HPLC法による定量は、ML-236B生産菌の培養物をアルカリ加水分解し、可溶性画分をC18カラムを用いた逆相HPLCに供し、紫外吸収を測定し、該吸収を定量化することにより行なうことができる。C18カラムとしては、通常の逆相HPLCに使用されるC18カラムであれば特に限定されないが、例えば、SSC-ODS-262 (直径6mm、長さ100mm: センシユー科学(株)製) 等が挙げられる。移動相としては、通常逆相HPLCに使用される溶媒であれば特に限定されないが、例えば、75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸等が挙げられる。移動相に流速2ml/分の75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用いてSSC-ODS-262カラムにML-236Bを室温で添加すると、4.0分後に溶出される。ML-236Bの検出は、HPLC用UV検

出器を用いて行なうことができ、UV検出器の吸収波長は、220乃至280 nmであり、好適には220乃至260 nm、より好適には236 nmである。

機能発現が確認された遺伝子を有する所望の組換えDNAベクターは、ML-236Bの生産性の改善に有用である。

なお、本明細書においては、アデニンを「a」、グアニンを「g」、チミンを「t」、シトシンを「c」とそれぞれ記載する。配列表の各配列番号に示される塩基配列は、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン（特許庁刊行、平成10年6月）」に従って記載した。

「図面の簡単な説明」

図1：大腸菌及び糸状菌に導入させることができ且つ長いDNAを挿入することができるDNAベクターpSAKcos1の構築図。

図2：pML48挿入配列の構造遺伝子解析。

図3：pML48挿入配列のノーザンブロット・ハイブリダイゼーション。

「発明を実施するための最良の形態」

以下に実施例及び試験例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例1. pSAKcos1ベクターの作製

1) 大腸菌由来のハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）を制限酵素BamHI（宝酒造（株）製）で消化し、T4DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）で末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用いて上記DNA断片を自己環状化し、大腸菌のコンピテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。形質転換大腸菌からBamHI部位を欠失したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK

360と命名した。

3) pSAK360を制限酵素PvuIIで消化した後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、5'末端の脱リン酸化を行なった。コスミドベクターpWE15 (STRATAGENE社製) からコス (cos) 部位を含む [SalI-ScaI] 断片 (約3kb) を取得し、T4 DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後、pSAK360のPvuII部位に連結し、JM109株を形質転換した。該形質転換大腸菌から [SalI-ScaI] 断片 (約3kb) をPvuII部位に挿入したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAKcos1と命名した。pSAKcos1は、pWE15由来のBamHI、EcoRI及びNotIの各制限酵素認識部位を1つずつ有する。また、pSAKcos1は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、40 µg/mlのアンピシリンを培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、200 µg/mlのハイグロマイシンB (hygromycin B) を培地に添加して行なった。

pSAKcos1の構築手順を図1に記載した。

実施例2. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAの調製

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の培養

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の種菌の培養はPGA寒天培地を用いたスラントにて行なった。すなわち、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を白金耳により接種し、26℃にて14日間保温した。このスラントは4℃で保存した。

本培養は、液体通気培養にて行なった。上述のスラント5mm角の菌体を50

mlのMBG3-8培地を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、26℃、210rpmの条件下で5日間振盪培養した。

2) ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の培養物からのゲノムDNAの調製

1) の培養物を、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離し、菌体を回収した。湿重量3gの菌体を、ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉末になるまで破碎した。菌体破碎物を20mlの62.5mM EDTA・2Na（和光純薬（株）製）-5%（w/v）SDS-50mM Tris（和光純薬（株）製）-塩酸（和光純薬（株）製）緩衝液（pH8.0）で満たした遠心管に入れ、穏やかに混合した後、0℃にて1時間静置した。10mM Tris-塩酸-0.1mM EDTA・2Na（pH8.0：以下「TE」という。）で飽和した10mlのフェノールを添加し、50℃にて1時間穏やかに攪拌した。室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した後、15mlの上層（水相）を別の遠心管にとり、0.5倍容のTE飽和フェノール及び0.5倍容のクロロホルム溶液を加え、2分間穏やかに攪拌した後、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した（以下、「フェノール・クロロホルム抽出」という。）。10mlの上層（水相）に10mlの8M 酢酸アンモニウム（pH7.5）及び25mlの2-プロパノール（和光純薬（株）製）を添加し、-80℃にて15分間冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した。沈澱を5mlのTEに溶解させた後、20μlの10mg/mlリボヌクレアーゼA（Sigma社製）及び250単位のリボヌクレアーゼT1（GIBCO社製）を添加し、37℃にて20分間保温した。これに20mlの2-プロパノールを添加し、穏やかに混合した後、糸状のゲノムDNAをパスツールピペットの先端に巻きつけ、1mlのTEに溶解させた。このDNA溶液に0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム（pH6.5）及び2.5倍容のエタノールを加え、-80℃にて15分冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で5分間遠心分離した（以下、「エタノール沈澱」という。）。得られた沈澱を200μlのTEに溶解し、ゲノムDNA画分とした。

実施例 3. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーの作製

1) ゲノムDNA断片の調製

実施例 2 において得られたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (50 μ g) を含む 100 μ l の水溶液に、0.25 単位の *Sa*u3AI (宝酒造 (株) 製) を添加した後、10、30、60、90 及び 120 秒経過後に 20 μ l ずつサンプリングし、各サンプルに 20 μ l ずつの 0.5M EDTA (pH 8.0) を加えて制限酵素反応を停止した。アガロースゲル電気泳動により、得られた部分消化DNA断片を分離し、30 kb 以上の大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。

回収したゲルを細かく碎き、ウルトラフリーC3遠心式ろ過ユニット (日本ミリポア (株) 製) に入れた。-80℃にて15分間冷却し、ゲルを凍結した後、37℃にて10分間保温してゲルを融解した。5000×G、5分間遠心分離し、DNA抽出液を得た。このDNA抽出液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

2) DNAベクター pSAKcos1の前処理

pSAKcos1を制限酵素BamHI (宝酒造 (株) 社製) により消化した後、65℃にて30分間アルカリフォスファターゼ (宝酒造 (株) 製) 反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

3) ライゲーション及びin vitroパッケージング

上記 1) 記載のゲノムDNA断片 (2 μ g) 及び上記 2) 記載の前処理済み pSAKcos1 (1 μ g) を混合し、DNA ligation kit Ver. 2 (宝酒造 (株) 製) を用い、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を5 μ l のTEに溶解させた。ライゲーション生成物溶液を、GIGAPAK II Gold (STRATAGENE社製) キッ

トを用いた *in vitro* パッケージングに供し、組換えDNAベクターを含む形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌のコロニーを形成させたプレートに3 mlのLB培地を注ぎ、セルスクレーパーを用いてプレート上のコロニーを回収した（回収液1という）。さらに3 mlのLB培地でプレートを洗浄、回収した（回収液2という。）。回収液1及び2の混合液にグリセリンを終濃度18%となるよう加えたものを大腸菌菌体液と称し、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNAライブラリーとして、 -80°C にて保存した。

実施例4. ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNAを
鋳型としたPCRによるPKS遺伝子断片の増幅

1) PCR用プライマーの設計及び合成

アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) のPKS遺伝子のアミノ酸配列 (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載) に基づき、配列表の配列番号3及び4に示されるミックス・プライマーを設計した。

配列表の配列番号3 : gayaacngcntgyasttc

配列表の配列番号4 : tcncnknrcwgtgncc

なお、配列表の配列番号3及び4に示される塩基配列において、nはイノシンの塩基（ヒポキサンチン）を、yはt又はcを、sはg又はcを、kはg又はtを、rはg又はaを、wはa又はtを、それぞれ表わす。

2) PCRによるDNA断片の増幅

上記2) 記載のPCR用プライマー（各100 pmol）、実施例2で得られたペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNA（500 ng）、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.2 mM dTTP、50 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム及び1.25単位のEx. Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）を含む50 μ lの反応液を、 94°C にて1分間、 58°C にて2分間、 70°C にて3分間、の連続する3工程からなるサイクル反応に供した。このサイクルを30回繰り返

すことによりDNA断片を増幅した。PCRは、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000（宝酒造（株）製）を使用して行なった。

増幅されたDNA断片を、アガロースゲル電気泳動に供した後、約1.0乃至2.0 kbの大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

3) ライゲーション及び形質転換

2) で得られたDNA断片、及び、TAクローニング・システムpCR2.1（Invitrogen社製）を用いて、このキットに含まれるプラスミドpCR2.1にライゲーションし、形質転換株を得た。

得られたクローンを数個選び、マニアティスら（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載）の方法に従って培養した。すなわち、2 mlのLB培地を含む24 ml容の試験管に各コロニーを接種し、37℃にて18時間、振盪培養した。

この培養物からの組換えDNAベクターの調製は、アルカリ法（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載）に従った。すなわち、1.5 mlの培養液を、室温、10000×Gの条件下で2分間遠心分離し、沈澱より菌体を回収した。菌体に100 μlの50 mM グルコース－25 mM Tris-塩酸－10 mM EDTA（pH 8.0）を加えて懸濁し、200 μlの0.2規定水酸化ナトリウム－1%（w/v）SDSを加えて穏やかに攪拌し、溶菌させた。これに150 μlの3M 酢酸カリウム－11.5%（w/v）氷酢酸を加えてタンパク質を変性させ、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離し、上清を回収した。上清について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を40 μg/mlのリボヌクレアーゼA（Sigma社製）を含有する50 μlのTEに溶解させた。

各組換えDNAベクターを制限酵素消化して電気泳動に供し、電気泳動パターンの異なる組換えDNAベクター中の挿入塩基配列を、DNAシーケンサー（モデル377：パーキンエルマー・ジャパン社製）を用いて決定した。

その結果、PKS遺伝子断片を含む組換えDNAベクターを保有する株の存在が確認された。

実施例5. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノミック・サザンブロットハイブリダイゼーション

1) 電気泳動及びメンブレンへのトランスファー

実施例2において得られたのペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (10 μ g) を、制限酵素EcoRI、SalI、HindIII又はSacI (いずれも宝造 (株) 製) を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルの調製には、Agarose L03「TAKARA」(宝酒造 (株) 製) を用いた。泳動後、ゲルを0.25規定塩酸 (和光純薬 (株) 製) に浸し、室温にて10分間穏やかに振盪した。このゲルを0.4規定水酸化ナトリウム (和光純薬 (株) 製) 中に移し、室温にて30分間穏やかに振盪した。マニアティスらのアルカリトランスファー法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 記載) により、ゲル中のDNAをナイロン・メンブレンHybond™-N+ (アマシャム社製) にトランスファーし、固定した。メンブレンを2×SSC (1×SSCの組成は、150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム) で洗浄した後風乾した。

2) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

1) で得られたメンブレンに対し、実施例4で得られたPKS遺伝子断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行なった。

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1 μ g) をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIG イーザーハイブ: ベーリンガー・マンハイム社製) に 1) 記載のメンブレンを浸し、20 rpm で振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、マルチシェーカー・オーブンHB (TAITEC社製) を用い、20 rpm で振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた55℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製) で処理し、X線フィルム (ルミフィルム: ベーリンガー・マンハイム社製) に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A (Fujifilm社製) を用いて行なった。

その結果、実施例4において得られたPKS遺伝子断片はペニシリウム・シトリナムのゲノム上に存在することが確認された。

実施例6. PKS遺伝子断片をプローブとしたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

PKS遺伝子を含むゲノムDNAのクローニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行なった。

1) メンブレンの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーとして保存した大腸菌菌体液 (実施例3記載) を、LB寒天培地のプレートに、プレート1枚あたり5000乃至10000個のコロニーが生育するよう希釈して撒いた。このプレートを26℃にて18時間保温した後、4℃にて1時間冷却した。Hybond™-N+ (アマシャム社製) をプレートにのせ、1分間接触させた。コロニーを付着させたメンブレンをプレートから注意深く離し、コロニー接触面を上にして、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5規定

水酸化ナトリウムに7分、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5M Tris-塩酸-1mM EDTA (pH7.5)に3分ずつ2回浸した後、400mlの2×SSCで洗浄した。洗浄したメンブレンを30分風乾した。

2) ハイブリダイゼーション

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1μg)をDIG DNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIGイーザーハイブ:ベーリンガー・マンハイム社製)に1)記載のメンブレンを浸し、20rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に加え、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製)を用い、20rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた68℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製)で処理し、X線フィルム (ルミフィルム:ベーリンガー・マンハイム社製)に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A: Fuji Film社製)を用いて行なった。

以上、1)及び2)記載の操作をスクリーニングという。

一回目のスクリーニングで陽性シグナルが検出されたクローンのコロニー周辺をかきとってLB培地に懸濁した後、適宜希釈してプレートに撒いて培養し、同様に二回目のスクリーニングを行ない、陽性クローンを純化した。

なお、本実施例で得られた陽性クローン、すなわち形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199は、平成11年(1999年)7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付さ

れた。

実施例 7. 組換え DNA ベクター pML 48 の挿入配列の解析 (1)

実施例 6 で得られた *E. coli* pML 48 SANK 71199 株の培養及び該培養物からの組換え DNA ベクターの調製は、実施例 4 記載の方法に準じて行なった。

得られた組換え DNA ベクターを pML 48 と命名した。pML 48 挿入配列を各種制限酵素消化し、pUC119 (宝酒造 (株) 製) に組込むことにより、サブクローニングした。得られたサブクローンをプローブとして、実施例 5 記載の方法に準じてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行なった。すなわち、pML 48 の各種制限酵素消化物を電気泳動に供し、DNA をメンブレンへトランスファーしたものに対して、ハイブリダイゼーションを行なった。

その結果、pML 48 挿入配列の制限酵素地図が作成された。

また、上述の各サブクローンの挿入配列の塩基配列を、DNA シークエンサーモデル 377 (パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて決定し、pML 48 の全塩基配列を決定した。

pML 48 の挿入配列は全 34203 塩基であった。

pML 48 の挿入配列の塩基配列は、配列表の配列番号 1 及び 2 に記載されている。配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

該挿入配列上の構造遺伝子の存在について、遺伝子検索プログラム GRAIL (ApoCom GRAIL Toolkit: APOCOM 社製) 及び相同性検索プログラム BLAST (Gapped-BLAST (BLAST2): WISCONSIN GCG package ver. 10.0 に搭載) を用いて解析した。

その結果、pML 48 の挿入塩基配列中には、6 種類の異なる構造遺伝子の存在が推定され、それぞれを *mlcA*、*mlcB*、*mlcC*、*mlcD*、*mlcE* 及び *mlcR* と命名した。また、*mlcA*、*mlcB*、*mlcE* 及び *mlcR* は

配列表の配列番号2記載の塩基配列中に、m1cC及びm1cDは配列表の配列番号1に示される塩基配列中に、それぞれコード領域を有していることが推定された。さらに、該挿入配列における各推定構造遺伝子の相対的位置及び大きさが推定された。

本実施例の結果を図2に記載した。

実施例8. 組換えDNAベクターpML48の挿入配列の解析(2)

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法及びRACEにより、実施例7において存在が示唆された構造遺伝子の発現解析、及び5' -末端並びに3' -末端領域の解析を行なった。

1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラント(実施例2記載)より5mm角の菌体を10mlのMGB3-8培地を入れた100ml容の三角フラスコに接種し、26℃にて3日間、振盪培養した。

培養物からの全RNAの調製は、グアニジン・イソチオシアネート法を利用したRNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社製)を用いて行った。すなわち、培養物を、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して菌体を回収し、湿重量2gの菌体を液体窒素により凍結した後、乳鉢上で粉末になるまで破碎した。この破碎物をグアニジン・イソチオシアネートを含む4mlの菌体溶解バッファー(このキットに含まれる。)に懸濁した。懸濁液をこのキットに含まれるQIAshredderスピンカラム10本に450μlずつ分注し、室温、1000×G、10分間遠心分離した後、溶出液をそれぞれ回収した。各溶出液に225μlのエタノールを加えた後、このキットに含まれるRNAミニスピンカラムに添加した。このカラムをこのキットに含まれる洗浄用緩衝液で洗浄した後、50μlずつのリボヌクレアーゼ・フリー蒸留水で吸着物を溶出させ、溶出液を全RNA画分とした。

2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

20μgのペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAを含む

2. $25 \mu\text{l}$ の水溶液に、 $1 \mu\text{l}$ の $10\times\text{MOP S}$ (組成; 200 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸、 50 mM 酢酸ナトリウム、 10 mM EDTA $\cdot 2\text{Na}$ 、 $\text{pH } 7.0$; 121°C にて20分間オートクレーブ滅菌してから使用した。: 同仁化学研究所 (株) 製)、 $1.75 \mu\text{l}$ のホルムアルデヒド及び $5 \mu\text{l}$ のホルムアミドを添加して混合し、RNA サンプルとした。この RNA サンプルを、 65°C にて10分間保温した後、氷水中で急冷し、アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動のゲルは、 10 ml の $10\times\text{MOP S}$ 及び 1 g の *Agarose* L03「TAKARA」(宝酒造 (株) 製) を 72 ml のピロカルボン尼克・アシッド・ジエチルエステル (Sigma 社製) 処理水に混合し、加熱してアガロースを溶解させた後冷却させ、 1.8 ml のホルムアルデヒドを添加することにより作製した。サンプルバッファーは、 $1\times\text{MOP S}$ ($10\times\text{MOP S}$ を水で10倍希釈したもの。) を使用した。ゲル中の RNA を、 $10\times\text{SSC}$ 中で *Hybond*TM-N+ (アマシャム社) へトランスファーした。

プローブには、pML48 挿入配列を下記表1記載の制限酵素1及び2で消化することにより得られるDNA断片 (a、b、c、d 及び e) を用いた。

表1. ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションのプローブ

プロ ーブ	制限 酵素1	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*	制限 酵素2	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*
a	EcoRI	6319~6324	EcoRI	15799~15804
b	BamHI	16793~16798	PstI	18164~18169
c	KpnI	26025~26030	BamHI	27413~27418
d	SalI	28691~28696	SalI	29551~29556
e	HindIII	33050~33055	SacI	34039~34044

* 各ヌクレオチド番号は、配列表の配列番号1に基づく。

プローブの標識、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、実施例5のサザンブロット・ハイブリダイゼーションに従って行なった。

本実施例の結果を図3に記載した。

各シグナルは各プローブの塩基配列と相同な転写産物の存在を示す。

本実施例でpML48挿入配列上に存在が推定された6つの構造遺伝子のうち、mlcB、mlcD、mlcE及びmlcRはペニシリウム・シトリナム SANK13380株内で転写されていることが確認され、mlcA及びmlcCについても該細胞内で転写されていることが示唆された。

各シグナルの位置は、転写産物の相対的なサイズを示すものではない。

3) 5' RACEによる5' -末端配列の決定

各構造遺伝子の5' -末端領域を含むcDNAの取得は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO社製)を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり且つ該遺伝子の5' -末端近傍に位置すると考えられる塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNAを2種類作製した。

表2に、各構造遺伝子の、より3' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA (1) の塩基配列を、表3に、より5' -側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA (2) の塩基配列を、それぞれ記載した。

表2. 5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴDNA (1)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 5 : gcatgttcaatttgctctc
mlcB	配列番号 6 : ctggatcagacttttctgc
mlcC	配列番号 7 : gtcgcagtagcatgggcc
mlcD	配列番号 8 : gtcagagtgatgctcttctc
mlcE	配列番号 9 : gttgagaggattgtgagggc
mlcR	配列番号 10 : ttgcttggtgttgattgtc

表 3. 5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴDNA (2)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 1 1 : catggtactctcgcccgttc
mlcB	配列番号 1 2 : ctccccagtagtaagctc
mlcC	配列番号 1 3 : ccataatgagtgtgactgttc
mlcD	配列番号 1 4 : gaacatctgcatccccgtc
mlcE	配列番号 1 5 : ggaaggcaaagaaagtgtac
mlcR	配列番号 1 6 : agattcattgctgttggtcatc

オリゴDNA (1) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株の全RNAを鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。すなわち、1 μ gの全RNA、2.5 pmolのオリゴDNA (1)、1 μ lのSUPER SCRIPT™ II reverse transcriptase (このキットに含まれる。)を含む24 μ lの反応液を、16℃にて1時間保温した後、生成物をこのキットに含まれるGLASSMAXスピナートリッジに添加してcDNA第一鎖を精製した。

cDNA第一鎖の3' -末端に、このキットに含まれるterminal deoxyribonucleotidyl transferaseによりポリC鎖を付加させた。

3' -末端にポリC鎖の付加したcDNA第一鎖、40 pmolのオリゴDNA (2) 及び40 pmolのAbridged Anchor Primer (このキットに含まれる) を含む50 μ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて1.8時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いてクローニングした。

以上の操作を 5' RACE という。

5' -末端を含む cDNA 断片の塩基配列を決定し、転写開始点及び翻訳開始コドンの位置を推定した。

5' RACE により得られた各構造遺伝子に対応する 5' -末端 cDNA 断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表 4 に表示した。また、表 5 に、各構造遺伝子の転写開始点及び翻訳開始の存在する配列番号、転写開始点の位置及び翻訳開始点の位置を記載した。

表 4. 各 5' -末端 cDNA 断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号 17
mlcB	配列番号 18
mlcC	配列番号 19
mlcD	配列番号 20
mlcE	配列番号 21
mlcR	配列番号 22

表 5. 各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始コドンの位置

遺伝子	翻訳開始コドンの	配列番号 1 又は 2 におけるヌクレオチド	
番号	存在する配列番号 *	転写開始点	翻訳開始コドン
mlcA	配列番号 2	2 2 9 1 3	2 3 0 4 5 ~ 2 3 0 4 7
mlcB	配列番号 2	1 1 6 8 9	1 1 7 4 8 ~ 1 1 7 5 0
mlcC	配列番号 1	1 1 6 4 1	1 1 7 9 6 ~ 1 1 7 9 8
mlcD	配列番号 1	2 4 0 6 6	2 4 3 2 1 ~ 2 4 3 2 3
mlcE	配列番号 2	3 3 9 9	3 5 4 5 ~ 3 5 4 7
mlcR	配列番号 2	3 6 5	4 0 0 ~ 4 0 2

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的であ

る。

4.) 3' RACEによる3' -末端配列の決定

各構造遺伝子の3' -末端領域を含むcDNAの取得は、Ready To Go : T-Primed First-Strand kit (ファルマシア社製) を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入塩基配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり、構造遺伝子の3' -末端近傍に位置すると考えられるセンス側のオリゴDNA (3) を1種類ずつを作製した。

表6に各構造遺伝子について作製したオリゴDNA (3) の塩基配列を表示した。

表6. 3' RACEによる3' -末端配列解析に用いるオリゴDNA (3)

遺伝子	配列表の配列番号 : 塩基配列
mlcA	配列番号 23 : atcataccatcttcaacaac
mlcB	配列番号 24 : gctagaatagggttacaagcc
mlcC	配列番号 25 : acattgccaggcaccagac
mlcD	配列番号 26 : caacgcccaagctgccaatc
mlcE	配列番号 27 : gtcttttcctactatctacc
mlcR	配列番号 28 : ctttcccagctgctactatc

オリゴDNA (3) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株の全RNA (1 μ g) を鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。

cDNA第一鎖、40 pmolのオリゴDNA (3) 及びNotI-d (T) 18プライマー (このキットに含まれる。) を含む100 μ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分

間、4℃にて18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてPCR2.1を用いてクローニングした。

以上の操作を3' RACEという。

得られたcDNAの3' -側断片の塩基配列を決定し、翻訳終止コドンの位置を推定した。

3' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する3' -末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表7にまとめた。また、表8に、各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該コドンの位置を配列表の配列番号1又は2に基づいて記載した。

表7. 各3' -末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号29
mlcB	配列番号30
mlcC	配列番号31
mlcD	配列番号32
mlcE	配列番号33
mlcR	配列番号34

表8. 各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該翻訳終止コドンの位置

遺伝子	翻訳終止コドン	翻訳終止コドンの存在する配列番号*	配列番号1又は2における翻訳終止コドンのヌクレオチド番号
mlcA	tag	配列番号2	32723～32725
mlcB	taa	配列番号2	19840～19842
mlcC	taa	配列番号1	13479～13481

mlcD	tga	配列番号 1	2 7 8 9 0 ~ 2 7 8 9 2
mlcE	tga	配列番号 2	5 7 3 0 ~ 5 7 3 2
mlcR	tag	配列番号 2	1 9 1 5 ~ 1 9 1 7

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、各構造遺伝子がコードすると推定されるポリペプチドの C 末端のアミノ酸残基、そのアミノ酸残基をコードするトリヌクレオチドの塩基配列及びそのトリヌクレオチドの位置を表 9 に記載した。

表 9. 各構造遺伝子のコードするポリペプチドの C 末端アミノ酸

遺 伝 子	C 末端 アミノ 酸残基	該アミノ酸をコー ドするトリヌクレ オチドの塩基配列	該トリヌクレ オチドの存在 する配列番号 *	配列番号 1 又は 2 にお ける該トリヌクレオチ ドのヌクレオチド番号
mlcA	アラニン	gcc	配列番号 2	32720 ~ 32722
mlcB	セリン	agt	配列番号 2	19837 ~ 19839
mlcC	システイン	tgc	配列番号 1	13476 ~ 13478
mlcD	アルギニン	cgc	配列番号 1	27887 ~ 27889
mlcE	アラニン	gct	配列番号 2	5727 ~ 5729
mlcR	アラニン	gct	配列番号 2	1912 ~ 1914

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

また、表 8 記載の翻訳終止コドンに対する相補配列、該相補配列の存在する配列番号、及び、該相補配列の位置を表 10 にまとめた。

表 10. 各構造遺伝子の翻訳終始コドンに対する相補配列

遺伝子	翻訳終始コドン	該相補配列の存在	配列番号 1 又は 2 におけ
-----	---------	----------	-----------------

に対する相補配 する配列番号 *		る該相補配列のヌクレオ チド番号	
列			
mlcA	cta	配列番号 1	1 4 7 9 ~ 1 4 8 1
mlcB	tta	配列番号 1	1 4 3 6 2 ~ 1 4 3 6 4
mlcC	tta	配列番号 2	2 0 7 2 3 ~ 2 0 7 2 5
mlcD	tca	配列番号 2	6 3 1 2 ~ 6 3 1 4
mlcE	tca	配列番号 1	2 8 4 7 2 ~ 2 8 4 7 4
mlcR	cta	配列番号 1	3 2 2 8 7 ~ 3 2 2 8 9

* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

以上の通り、各構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子の転写産物及び翻訳産物を取得することが可能である。

実施例 9. 組換え DNA ベクター pML 48 を用いたペニシリウム・シトリナムの形質転換

ペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ナラらの方法 (Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載) に従った。

1) プロトプラストの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK 13380 株を培養したスラントより、白金耳を用いて PGA 寒天培地に接種し、26℃にて14日間保温した。該培養物よりペニシリウム・シトリナム SANK 13380 株の胞子を回収し、 1×10^8 個の胞子を 80 ml の YPL-20 培地に接種し、26℃にて1日間保温した。胞子の発芽を顕微鏡観察により確認した後、発芽胞子を、室温、5000×G の条件下で10分間遠心分離して胞子を沈澱として回収した。胞子を滅菌水で3回洗浄した後、プロトプラスト化を行なった。すなわち、200 mg のザイモリアーゼ 20 T (生化学工業 (株) 製) 及び100 mg のキチナーゼ (Sig

ma 社製) を 10 ml の 0.55 M 塩化マグネシウムに溶解し、室温、5000 × G の条件下で 10 分間遠心分離して得られた上清を酵素液とし、20 ml の酵素液及び湿重量 0.5 g の発芽胞子を 100 ml 容三角フラスコに入れ、30 °C にて 60 分間穏やかに振盪し、発芽胞子がプロトプラスト化したことを顕微鏡観察により確認した後、反応液を 3 G-2 ガラスフィルター (HARIO 社製) で濾過した。該濾液を、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離し、プロトプラストを沈殿として回収した。

2) 形質転換

1) で得られたプロトプラストを 30 ml の 0.55 M 塩化マグネシウム溶液で 2 回、30 ml の 0.55 M 塩化マグネシウム-50 mM 塩化カルシウム-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3 : 以下、「MCM 溶液」という。) で 1 回それぞれ洗浄し、100 μl の 4% (w/v) ポリエチレングリコール 8000-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸-0.0025% (w/v) ヘパリン (Sigma 社製)-50 mM 塩化マグネシウム (pH 6.3 : 以下、「形質転換用溶液」という。) に懸濁した。約 5×10^7 個のプロトプラストを含む 96 μl の形質転換溶液及び 120 μg の pML48 DNA を含む 10 μl の TE を混合し、氷上で 30 分間静置した。これに 1.2 ml の 20% (w/v) ポリエチレングリコール-50 mM 塩化マグネシウム-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3) を加えて穏やかにピペティングし、室温、20 分間静置した。これに 10 ml の MCM 溶液を加えて穏やかに混合し、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離した。沈殿より形質転換プロトプラストを回収した。

3) 形質転換プロトプラストにおける細胞壁の再生

2) で得られた形質転換プロトプラストを 5 ml の液状の VGS 中層寒天培地に懸濁し、固化した 10 ml の VGS 下層寒天培地プレートに重層した。該プレートを、26 °C にて 1 日間培養した後、プレート 1 枚につき 5 mg のハイグロマイシン B (Hygromycin B : Sigma 社製) を含む 10 ml の液状の VGS 上層寒天培地を重層した (ハイグロマイシン B の終濃度は 200 μg/

ml)。26℃にて14日間保温して得られた菌株を、200 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するPGA寒天培地上で継代培養した後、PGA寒天培地で作製したスラントに植え継ぎ、26℃にて14日間保温した。

これを形質転換株という。

該スラントは4℃で保存した。

試験例1. 形質転換株及び親株の有するML-236B生産能の比較

実施例9において得られた形質転換株及び親株ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養し、該培養物中のML-236B量を測定した。

形質転換株を培養したスラント（実施例9記載）又はペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラント（実施例2記載）より5mm角の菌体を、10mlのMBG3-8培地を入れた100ml容の三角フラスコに接種し、26℃にて2日間、振盪培養した後、3.5mlの50% (w/v) グリセリン溶液を添加し、さらに26℃にて10日間、振盪培養した。

該培養物10mlに50mlの0.2規定水酸化ナトリウムを加え、26℃にて1時間、振盪しつつ保温した後、室温、3000 \times Gの条件下で2分間遠心分離し、1mlの上清を回収し、9mlの50%メタノールと混合してHPLCに供した。

HPLCのカラムには、SSC-ODS-262（直径6mm、長さ100mm：センシュエ科学（株）製）を用い、移動相には75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用い、室温にて2ml/分の流速で溶出した。これら条件下において、ML-236Bはカラム添加後4.0分に溶出された。検出はUV検出器の吸収波長を236nmに設定して行なった。

形質転換株のうちML236B生産能の改善された株が5つ得られ、これらの生産能は親株より平均12%高かった。

この5株のML-236B生産能は、モノスポア処理等の継代を行なった後も安定に維持された。

「産業上の利用の可能性」

本発明においてML-236B生産菌より得られたDNAは、該生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善する。

また、該DNA上に6つの構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。本発明により、それぞれの構造遺伝子に対応するcDNAを取得することが可能になる。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203で示される塩基配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
2. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、請求項1記載のDNA。
3. 請求項1又は2記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
4. 請求項1又は2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
5. 請求項1乃至4のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター。
6. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、請求項5記載の組換えDNAベクター。
7. 請求項5又は6記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。
8. ML-236B生産菌であることを特徴とする請求項7記載の宿主細胞。
9. ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、請求項8記載の宿主細胞。
10. 請求項8又は9記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。
11. 大腸菌であることを特徴とする、請求項7記載の宿主細胞。
12. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、請求項11記載の宿主細胞。
13. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1。

14. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA2
(但し、該PCR用プライマーA2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

15. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA3
(但し、該PCR用プライマーA3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

16. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA4
(但し、該PCR用プライマーA4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

17. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号1479のシトシン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーB1。

18. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と70%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB2

(但し、該PCR用プライマーB2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

19. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と80%以上の相同

性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB3

(但し、該PCR用プライマーB3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

20. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と90%以上の同一性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB4

(但し、該PCR用プライマーB4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

21. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号11748のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーC1。

22. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC2

(但し、該PCR用プライマーC2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

23. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC3

(但し、該PCR用プライマーC3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

24. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

25. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1。

26. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD2

(但し、該PCR用プライマーD2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

27. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD3

(但し、該PCR用プライマーD3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

28. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD4

(但し、該PCR用プライマーD4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

29. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号11796のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーE1。

30. 請求項29記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE2

(但し、該PCR用プライマーE2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番

号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 1 . 請求項 2 9 記載の P C R 用プライマー E 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の同一性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー E 3

(但し、該 P C R 用プライマー E 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 2 . 請求項 2 9 記載の P C R 用プライマー E 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー E 4

(但し、該 P C R 用プライマー E 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 3 . 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 2 0 7 2 3 のチミン又はそれより 5 ' - 側の塩基を 5 ' - 末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を有する P C R 用プライマー F 1 .

3 4 . 請求項 3 3 記載の P C R 用プライマー F 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の同一性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー F 2

(但し、該 P C R 用プライマー F 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 5 . 請求項 3 3 記載の P C R 用プライマー F 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の同一性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー F 3

(但し、該 P C R 用プライマー F 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基を C 末端とする

ポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

36. 請求項33記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF4

(但し、該PCR用プライマーF4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

37. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号24321のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーG1。

38. 請求項37記載のPCR用プライマーG1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーG2

(但し、該PCR用プライマーG2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号24321乃至24323でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

39. 請求項37記載のPCR用プライマーG1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーG3

(但し、該PCR用プライマーG3が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号24321乃至24323でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

40. 請求項37記載のPCR用プライマーG1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーG4

(但し、該PCR用プライマーG4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号24321乃至24323でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

41. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号6312のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配

列を含むPCR用プライマーH1。

42. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH2

(但し、該PCR用プライマーH2は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

43. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH3

(但し、該PCR用プライマーH3は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

44. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH4

(但し、該PCR用プライマーH4は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

45. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号3545のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI1。

46. 請求項45記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI2

(但し、該PCR用プライマーI2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

47. 請求項45記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI3

(但し、該PCR用プライマーI3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペ

チドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

48. 請求項 45 記載の PCR 用プライマー I 1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー I 4

(但し、該 PCR 用プライマー I 4 が、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 3545 乃至 3547 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

49. 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 28472 のチミン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 1。

50. 請求項 49 記載の PCR 用プライマー J 1 の塩基配列と 70% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 2

(但し、該 PCR 用プライマー J 2 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 5727 乃至 5729 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

51. 請求項 49 記載の PCR 用プライマー J 1 の塩基配列と 80% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 3

(但し、該 PCR 用プライマー J 3 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 5727 乃至 5729 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

52. 請求項 49 記載の PCR 用プライマー J 1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー J 4

(但し、該 PCR 用プライマー J 4 は、配列表の配列番号 2 のヌクレオチド番号 5727 乃至 5729 によりコードされるアラニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

53. 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 400 のアデニン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー K 1。

54. 請求項 53 記載の PCR 用プライマー K 1 の塩基配列と 70% 以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK2

(但し、該PCR用プライマーK2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

55. 請求項53記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK3

(但し、該PCR用プライマーK3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

56. 請求項53記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK4

(但し、該PCR用プライマーK4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

57. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号32287のシトシン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL1。

58. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL2

(但し、該PCR用プライマーL2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

59. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL3

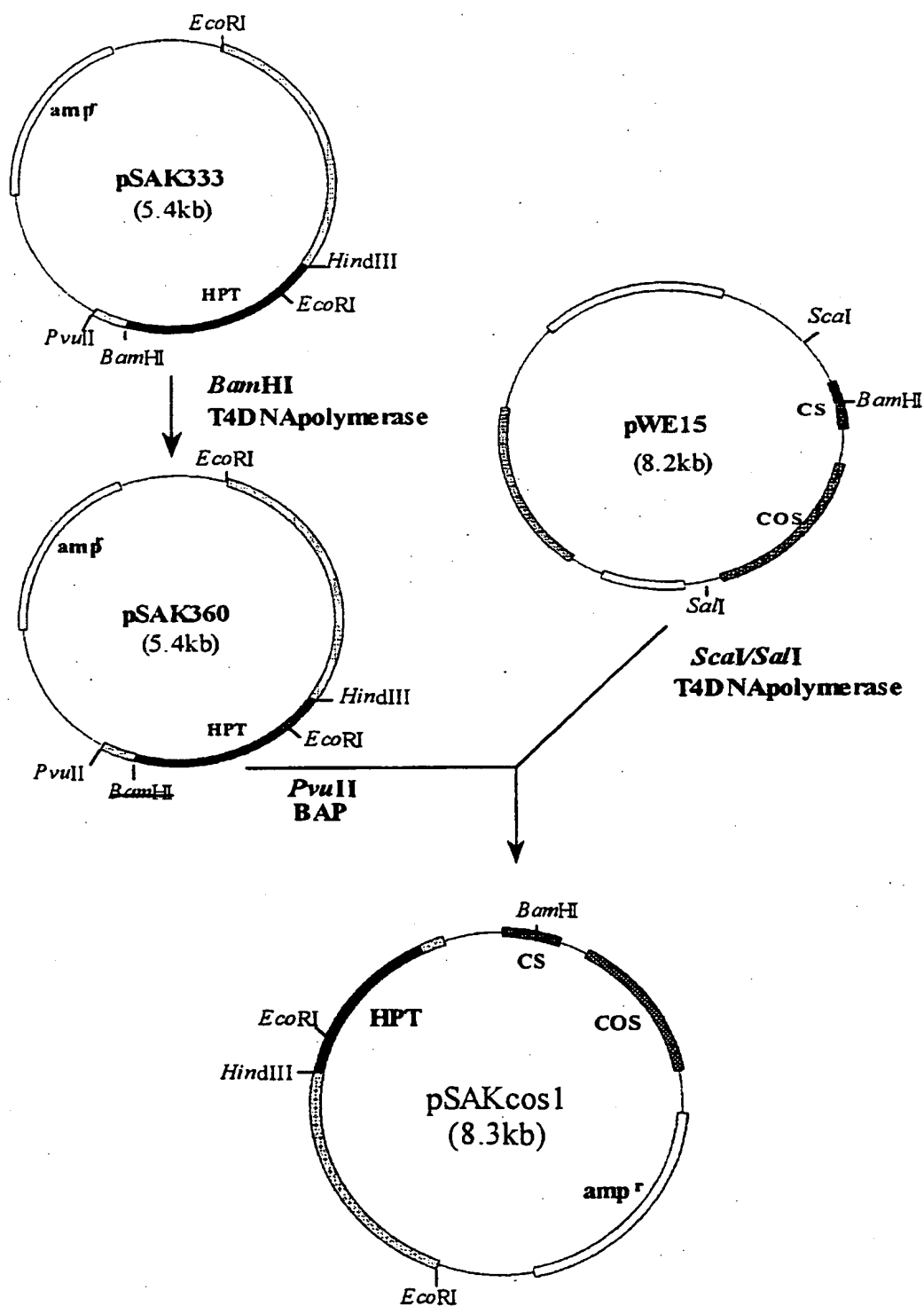
(但し、該PCR用プライマーL3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

60. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と90%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL4
(但し、該PCR用プライマーL4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

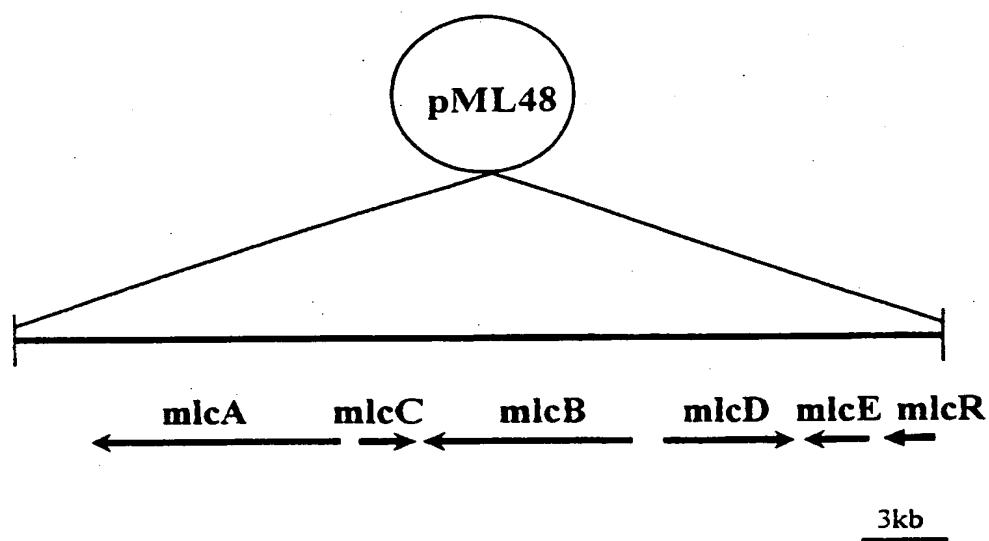
1/3

【図 1】



【図 2】

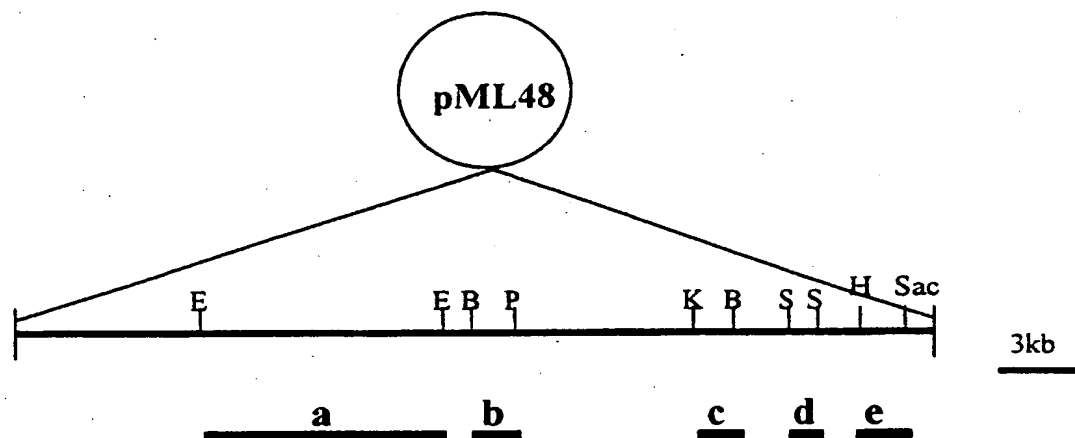
pML48 挿入配列上の推定構造遺伝子(mlcA,mlcB,mlcC,mlcD,mlcE,mlcR)の位置、大きさ及び方向



3/3

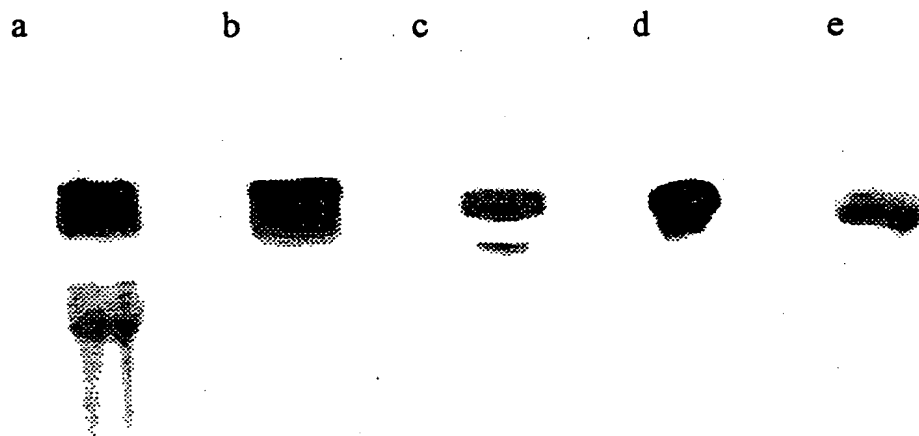
【図3】

A ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションに使用したプローブ (a,b,c,d,e) の位置



E; EcoRI, B; BamHI, P; PstI, K; KpnI, S; Sall, H; HindIII, Sac; SacI

B ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果



SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> DNAs related the biosynthesis of ML-236B

<130> 2000103SW

<140>

<141>

<150> JP HEI 11-227696

<151> 1999-8-11

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 1

gatcaatact acgtcgttgt tatttccttg tcagtaatga ctaacaaatt ccccagaaca 60
gacgaagtca cagtcacac cacaagagaa aatgagtgca gcgaggatta cagatttctc 120
gccaggcaaa ccgagaaaag ctctcttatg catccacggt gccgggtgct cagcagccat 180
attccgcgtc cagatctcta aactgcgcgt ggcgttgaaa aacgagtttg aattcgata 240
tgcgaccgcg ccgtttagct ccagcccccgg acccggcgtg ctctctgtct tccaaggcat 300

gggtccatac tacacctggt tccaaaagca tcatgacgcc gttacaaaca cgacaacccc 360
cacggtgggc gatagagtag cggctgtgat cgggcctgtg caaaagaccg tccaagattg 420
gtctataact aacccacagg caccattgt cggcatagtg gccttctctg agggcgcat 480
ggtcgccact ttgctgctcc atcaacagca aatgggaaaa ctgccatggt ttccgaaaat 540
gagcattgct gttttgattt gctgtttcta tagcgatgaa gccagagatt acatgagagc 600
cgaggcgcaa gacgacgacg acaagctaataatcaacgtg ccgacactgc atcttcacgg 660
tcgtcaagat ttgtctctcc aagggtcgag acagatgggt gaaacacatt acctgcctca 720
gaatgcagat gtactcgagt ttcagggaaa gcataatttt cccaacagac cgagtgatgt 780
ccaggagacg gtcaagcgt tccaacagct atatcaaaag gtcaagatgt caggttcatt 840
tgtctaggtg agacaacagg gtatatagca aggtctctggc tctcatgcct agtcatacc 900
acatttttac tgaacaaatt tgaatagttc taatcttaca cggtttgaat gtcaccttc 960
caagggtgat ttagttatag tggtcgcgac catctcataa atatttcgtg aacatatttt 1020
ggatagatca tggaaggctc gttctgaaca ggcatgacag acatctaaaa cactcgatc 1080
accacaacaa ggcaactaac cagtaactat ggaactattt gcaatggcgt cgaatttata 1140
tacaggatgg attgaaatca attccaagcc ttggaggttt caccttctc acagagtctt 1200
tcgaaacgcg ctaccgaggt atatttatca cgttacgggt actctgaacc gcgctatcta 1260
acttgatgtt acgattgctg caataaagaa gagcaacgaa ggtagaagta attttgacaa 1320
agatacaaga cgaattcgct atttgtagat gaatatgcgt gtgtcaattg acgccgaatt 1380
caggatagat ttgccatctg ctctattgcc aatttctaataatctctttat catgaacaac 1440
actcaaacca cacatctgaa ttcacggcgc tgaacgatct aggccaactt cagagccggg 1500
ttcatcgaga acatagtgag gattgaagaa aagtggctca caaaggcctg agcgtgctca 1560
gggccataca gcgagctctg aagtttgaca tgaatgagtg ggtccttggt agggtcattc 1620
cacatctcga gaacgatgtc ataaggagtg cgtcacggg aagcgagaac actcgtcatt 1680
ttggcattgc caattgagcc actctccgt tgacctgct tgtaatcaaa gacagcctgg 1740
aacaaggggg cgtgtgtctg agtcttgggt tctcgcctg aggtaggag attcaggcct 1800
agacagtcga ggatgacgcc atacggcacc cgcgcgtgtt gcatggcctc acgcacactg 1860
tccttggtgg ctacaagggtg ctgcgcgaat gtcttgctgc cgacgaactc atcaaagcgc 1920
aggggaagca cgttagcgaa aaagcccatc gccgaaattt ctccatggt ggatcggttg 1980
gtttcggcga ggccgatggt tatgtcttg ctgccggtaa gacgcgcaa caaacgtgg 2040

taggcggcca ggtagaactg catgggggtt gccttgtgct tgcggctccg ctctttgatt 2100
cggaaggcga ccatgggacg taaacgagca attgcttcat actgctgccg cgtgaatggc 2160
tgtatttgcg gctgctctga attggcagca gggtcattga tcagattcat gatgggaagc 2220
acggttggcg cagatgacga gactttgcta tgcattggact tccagaacgc gatatcgcc 2280
cccattcgcc cattttccag gttttccgcg tgttggacgg ctagatcaga gaattgggtc 2340
gatggtcgct gcattttcac cccgctgtaa atctgccga tctcattgaa caggttttct 2400
gttgttgagc catcaccaac taatctgtgg tagccgatta ccaacagggt gtcattctgt 2460
ccccagtaga aatcaacgag tctgagagtg tcacctgtgg agatgctata gtttgtcttc 2520
tcgagtttcc ggtactcttc ctctgcctcc gcagcgttgt tcacctgaac aaagtgcact 2580
ctgttctccg ggttcttgag aaccacttgg acgggacccat ttaaatcgct gctatagtca 2640
tcgccagtaa caaagcacgt acggaagatc tcgtgacggc gcaatgaggc tttcagagcc 2700
cgctcaacc ggtcgaggtc aatgggtacc ttcatgaaca tgccaatagt gttgttgaag 2760
atgggtatgat cttttaccat ttgttgctgc ctccaggaat actcctggcc aagggaaca 2820
ctctcgcgac gaagaatctt acggcctccc tgctcattat cgctctcttg ctcttcaccc 2880
tcttcggctg acgacgcac tgtgctggta gcagagcttg ctccatcatg gctgtctgtt 2940
gggtgcggag aagccccgct gtccgagggt cccgtggaat caccaatttg caacagcagc 3000
ggaatggatg tagctgggag tcgggtggcc gcgtcgctcg caagatcagc gacagaagca 3060
ccgccaaagta cctcaagag tgggagggtc aggtagagtt gctttgagaa ccatgagccg 3120
acagtcactg cacccaagga gtcgacacct tgatcaatga gaggaatggg tgggtccacg 3180
ctctccccgt ccgaaacttg gagggtaaca cggagtttct cagatagacc atctgcaact 3240
ttgttagttt gaactcgata tcaggaaacg catgagagat aacttacaa tcacgatttg 3300
ccgaaacttg tctaaagttg ttgcttgttt gagctggctg gcaatggagc cttagaccc 3360
tgatccattg tcgccaccgt ctccgcgttg accgggaatt ttgaagtctc cgaaacgagg 3420
gtcgttgaag taaataattc gatcttgaag cgcagggtca agatctggga taccctgggt 3480
aagctcaagg tcgccatgt caatgaccgt ctgctgctgt ggttgctgcc gggcacgctg 3540
gtcagacacg accgcttcgg cgaaaagcgt gtgcagctca tgctcttcaa ctgagtcaaa 3600
catgaaacgg atagcatcaa agtcctctc catctcgcc ctctgacaa accctacacc 3660
gtaaacggca ccaatatga tggttgatcc ctgtggttgt gcgttagtaa cttgacgtcg 3720
atgcatgata attcaggggt agaaaatacc gccaatctc tggcgacccg ttgctgggcc 3780

agagcctgta ggtaggcatt cgcagcgcca tagttggact ggccaggatt gccataact 3840
gcaacaatgg acgaaaacat gatgaagaag tcgagcgcc tgcgtcccgt ctgttcggag 3900
aaccgttcat gaagaatgcg tgctccttgt accttgggt tcaacacat gtccatcatc 3960
tggtgggtcca tgttcttcag catgacatcc tgcagcacca aaggcccgaa cgcgatgccg 4020
gcaacagggtg gcaacttcat atcgacaagc ttgccaaaggc cagcatcgac tgaatcctca 4080
ttggcaacat ccctaaagaa agtaattgga taagtaaagc aggatgtggt agcaagggtg 4140
gatgtgatat caatcaactt acattgacag aacggtgatg tcaccaccaa gtgcctccat 4200
gttggcgatc catttgggat caagtcgagg gttccggcta gtgagcacia catggcgggc 4260
gccatgcaag atcatccagc gacagagaga gcgaccaagg tccccggtta gaccaacaag 4320
caaatacgtc ttcttgttgg aaaataagtt accagagtcg atggggcaaa tcctagcgga 4380
cacctcattt tccttccagt cgatgacggt ggccagattg aagcgttggt cattgtggtt 4440
gacagagagc tgaccaggca agagaatttg tgtggctgta ataactttct cagtgtcgtc 4500
gacagtcgac gcagagacgg tatTTTTTgc cattgccaca gagtgtcga ggattggaat 4560
atctcaaca tgactaactt tgtatgtgga agctgtactt cggataagat agtcaccact 4620
gtacatgaag caactgggtg gtagcaactt ggccaaacgg ttggttatcc cggcagcagt 4680
ccggtcggta gacaagtcaa agaatgccat catgtttgtc ggccaggctgt gtttcagccg 4740
agcgtcgggtt tccttggcat gtaatcggat ccaaggagcc ggaatagttt tgacgtcgga 4800
cagagttgtt gccaaatgaa cctgaacacc gtaggttttg gccgactcca gaattgcttt 4860
gacgcagaag attggggggt ccataatcag aattgatgca tcagagccaa aggactgagc 4920
gctagagaga attgtttcgg caaggagggc tgcagctgtg gacaacaaga aggaactatc 4980
ctgccttcc gccatgttat cgggcagact atgcatgtag tttctcggta catgcagtat 5040
agatccatc ttctcagcca gggcgactac aggcacctca catgtattct ccagaatact 5100
gccctgcacg acatggaagt atccgagatg gccacgcga attgcctggg gaagagcgta 5160
gcgaacacga acagttgctt ttccagcatg acgagcgtct tctaacgaat cacacgtctc 5220
ggttgactca agatagtaca tcgatgagga tgctccctc gcctctttca gtgcaatggc 5280
cgtcttggac gaattaaagt taccgaaaat tggacgacga gacgagttca tacggtcgtt 5340
cctagcaata tcctgcttca aacgagggac ccaggcacga cccttgcacc agtacacttc 5400
gggctcatga gtccatgtta ttgattccaa aagctgatca tcgtctctc cgaagcgcaa 5460
aagttgctca acgaagaatt tgggtgtctag gttctccaca gtatcgacat cgaagacgtg 5520

cggtcccaag tcagggttct cgagcttgat tgtcctcaac attccgatgg tgctggcctg 5580
gtggggatga tcaatccagg cattctctgt cagccacatc atgcgtccgg cgtagaagag 5640
aagagacttg actgcctcaa acttgtcctc ttcaagggtg caaaacactt catcatcaag 5700
ttccgagagg atgacaaaag tcgacttagg ctgcaaggcc gggtcgtcga gaacactttc 5760
cagccgcttg acggagtga tgtgtctatg cggtagggca gctttcatgt cgttcaaaat 5820
gcgttcggtt tttgtcgatt cgcaccgat aaccactaat ggcggtgatg agtccttcaa 5880
tggagcagaa agtggatcat acaaacgctc aacgggtggca tccacagcat gtgtactgaa 5940
gacagacggg atcaaatcat cctctcgatc aagtgtccga ctatcgacgc cagagaaccc 6000
aactctcttg agggatgct cccattggtc aacggacccc gaggcactca aagcacgagt 6060
ttcgtcttct ccagtcctc gatcagcgaa aagcccagag atgaaggcga ggcgagcagg 6120
ctcgcgatgg gtgaccccg aagtaaccaa gtgaccaccc ggcttgagca aggaccttat 6180
gtgagccaat ttttctcga agttggagct ggcatggagg acatcggatg caataatcag 6240
atcgtaggag tgaggcttga atccttgctc tgctgggctt ctgttgatgt ctagtgcctc 6300
aaactgcatg agaccgtcga attcggaag ttgttcacgg gccttgccaa taacatccgc 6360
cgagatgtca gtgcaagtgt aactgttgaa accaagttga ggtgatgcaa gaacgcgctt 6420
cgtggcgatg cctgtacca agcctaaaaa gcgaacgaca gattagcaaa ctgcctagtt 6480
acttacattt cagattcgac ttaccgatct caaggatctc aatggattgg tagcgatgag 6540
caatttggt aaccagatcc tgaacgacgt gtattgtga gccaaaggcg agcttggttg 6600
tatagtactc ggtgaacaac ccatcgcggt tcatgatctc caaaggatcc ccgttcccgc 6660
gaacaattga aattaattct ttgcctaccc tttggatcag gcgcacatgt ggggtgggacg 6720
agttgcttca agtaaaagg taatataaaa gaatgaaaaa acacggaaca gctttgggtg 6780
tacctttcac acatttgctc aatgtgaaca gaagtgtcct cctcccaaga ctcttggtac 6840
cactgatggg ggccagcccg agcatcgcc tgaacctggt cacaccattc aatgtacttc 6900
tggaatgga ggtcggcatt ttgacggtcg tcgggggtta tctgggctag gaaggatttg 6960
atgtagaagt aaacgattcg ctgatggc agaatgtcct ccttgctccg agctatgac 7020
aacgtcgcag ggtcctccag cagtttttcg ggcgtagggg gtcccagac ccactttgcg 7080
aagattcggg ggtcggtcga agcagtcggg ggagagaaag gcttaaagac aatgttatca 7140
acttgaaaa gcgttgctt gtcgaatcg tacaccgtga tgcgccgct caggaaatca 7200
cccttgctgt gtgtgtgat tgtgtcaaac gcaagctcgg tttcaccaga attaccgcc 7260

gatatacaga gcgatggaat cagagtcact ctgtcaacgt gagtaggcac gtacaatgag 7320
cgtaggcgac gatctcctgg agaggaatac gctccaatga cagtctggaa cgcgatgtcc 7380
aggggcgctg ggtggagcaa gaggggctca ttgcgcaatt catccttaag tggaaggaaa 7440
gccaaaggtgc cgctagcttt ggagtcggcc ctctcatgg tctgcaaacg acggaagtct 7500
ttgctgtagt cataccaag gaggtcaagt tcccgataga agaaatcgat gttgacattg 7560
ttcatctggg ggtactcttc ctccaggtggc ggcaaaagct gcgatgacgg tgatgcctcg 7620
ccaagggtta tgacgatttg gcctttggcg gatgtcgaaa gctcactctc ctttgccaga 7680
caggaatcaa taacaaattt gaccgtgact tggccatccg catcattgtc actggtgact 7740
tcggctgtca agttcagctc cacggagggtg ttttcatctt caaacacgat ggctttgttg 7800
atgctcatgt ccaagatttc caggagctga acttgggcgg cacgctcacc agccaccttc 7860
atggcagctt ccatggccat aattatgtac ccagcagcgg ggaacacagt ctggccttgt 7920
agcgcgatgac cgtcgagcca ttccagatcc cggggcctga tgaagtttgt cactggaag 7980
gtcgatgctg tgctgtaaga agaaagcttt ccaagcagaa gatggggcgc acctccacga 8040
agatgctggc ggggtggagcg agattctgcc cagtattgac gagtatgac ccaagagtat 8100
gtgggcaatg actttgacag gttttgaacg gcacgatcgg gccggacttg ttgtacgaag 8160
ccctcggcgt cgatactccg aactccgaaa cgctcccaaa tgtatcccag acctccagca 8220
aaagcgtcca catcgtcaac gtttcgtgcc aagcaccgg tatacggcag ctccacaccg 8280
gcaagagcat ccttgatggt ggctagacac ggacccttga gagcagggtg ggcgccaatt 8340
tcgatggcga cgtcgattag acgatgagtg atgactgctt tctgcacagc ctgcgagaac 8400
aagaccggag agacgagatt gtctttccaa taagcgggca tcacatcctg tacagtcatt 8460
tgcttgctgg tctcgtggac ggcagagaac caagcaacac tategttacc ttggccatcg 8520
gcaacagcac agtcgcactc cagcaatgcc ttgacatatg gagctgcga tgggtgcatg 8580
tgatgcgaat ggtaggcctt gtcaactctc aagattctgg caaaagtga ttcatcctcc 8640
aagacacctt caacgtgctg gatagcatcc atgtcgccgg agaaggtcac actatccggt 8700
gaattgctag cggcgacgca gaccgaccc tcaaaggctt cgagctcgca tagttccttt 8760
gcgtcatcgt acgacatacc tgccgctagc atagcgctg tctggccgct tggagaagag 8820
gcatgctccg eggacacaac tccacgcaga tgcgcaatac ggatagcttg agtggcactg 8880
atgaatcctg ccgcaaaggc acaggcaatc tcacctgaac tgtggccgac aattgcaactg 8940
aactcgatac cagctgcagc gagaagtcgg accagaacga tttgtacggc gcagcataga 9000

ggctgggaga agctggcgag tctgacgttt gaggcacccc cttcaagcat gagctgggtca 9060
tacagtgtcc acgtaggccg atacttttca ggcagtgttt gcagtgaatt atccagctct 9120
tcgagaatgc ctctcacaaa tggcataccc accatgagct tcttcagcat gcccgccac 9180
tgtgcacett ggccagtaaa gacacctagt acgcgagggt tgtcattcgc gtcgggtcgg 9240
aagtcgggtga cgacctcacc gtccgcgatg gcagcctcca gtgccgcgcg ggctacttcc 9300
ttgttgtgtg ctgcaatgc acgacggaag ggcaagatag accgtttctc aagtaaggta 9360
tatgcgatat catgcatgtc cagtcatca tgcgtttcca gaaattggag catattttct 9420
agcgttgctt tcatggagcg ctgcgacttc gatgaaagca caaggggcaa gctgcatgca 9480
tctgcatctg aggtcacctc tgttaccact gctgtcggct tgtgtggagg agccatatac 9540
tcttcgataa tagcatgggc atttgtacca ccaaactctg atgtgtttat atgttttagct 9600
aacttcactt tcgtttctca gaagtgcagt tgaatcctta ccaaataaat taacgctgac 9660
tctgcgaggc tgcccgggcg caacaatcgg ccattctgtg gcctccgttg caattttcaa 9720
gtgcgtatag aacggagcga caccgggact gatctttctc aacagcaggt ttggcgggat 9780
cacgccattt cgtacagcaa acgatgcctt cattaagccc gcaataccag cagtgccttc 9840
cgtgtgaccg agaactgtct tgatgtgcc gacaaaaagc tcacttttct cgcgctcgt 9900
gtcgattgtt ccactcctgt gtccgaagaa ggctgttgca atagcctcag ctccctgtgg 9960
gtcacccggt ggtgtaccag ttctgggat ctctgtgtta gggagagaga gactttctgc 10020
aacttcata aggtgatac ttccaggga taccattac catgggttc aaagaactgg 10080
cagcgttctt gggggtttgt aatatcaaga ccagccttgg catatgtggc ccgaatgagg 10140
gcttcttgtg cgctatggtt tggcatttg atacctgtcg ttcggccatc ttggttgata 10200
ccggtctctc ggataacaca ctcgatactg tcccgtcgc gcagtgcctg gtcagcgtt 10260
ttcaggacaa tagagcaaac accttctaa aaagcagtta caggaggtca gtgccatctt 10320
gctttttttg aaaggaattg atgcattgc aacttactcc tctggcatat ccactggcag 10380
cagcatccca cattcgagat ctaccattgg gggacagcat gttcaatttg ctctccatta 10440
caaaggatcat ggggccaat atcagattcg caccggtgc aaccgcatg gtactctcgc 10500
ccgttctaag ctgttggaag gccagatgca cggcagctaa ggatgaacta caggctgtgt 10560
cgatcgtcat ctgcagaatc agtcaggaat ctgtcagcac ttgacgaagt cgggctcgt 10620
caatgagtgg cactcacact cggcccatgc cagtcgaaga agtatgatac acggttgagg 10680
gccacactga cagctacccc cgtggcagag tatgtaggaa tactatccaa ttcacgcgtc 10740

acgatagtct catagtcatg cgtcatcata ccgacgtaca cagcagtaga ggatccttga 10800
aggccttggga tccgtaggcc tgcgttggat acagcttcat agaccgtctc cagcagcagc 10860
ctttgctgtg ggtcaatcgt ttccggcctct ccagcttggga tgttgaagaa agaggcatca 10920
aaaccgcgta gatcctcctg cagcaagtat gcaaaggggtg cgttcgtgcg cccgggggtga 10980
gtgccatcgg ggctgtaaaa tgtatcgacg tcaaattctct ccttagggat cttgggtctgt 11040
acatcccggg gctctttgag cagctcccaa agttttgatg gtgtgttgac accacctgga 11100
aacgcacaac cgttccccac taccacaatt ggctcgtttg gatagttggc ttgatccata 11160
actgctgac ctgtttttgg gcgataggat tgggattaaa ccttgtcttg cgtcagtaga 11220
tcttctcact gcatgccggg cacaacattt gttcttacag aatcgcagag ttgaatctct 11280
gagcgaacaa gccggccttg caaccgatac cgtcgttata tttacttgca cgtatcagta 11340
ctcatctaga ttccggacaat ttcaagatcc attctagtac tcaaatgccc ccacttccca 11400
gcaatgcaag ctccggcacct agcaaacct cccggcgta ttcgggtgac gaatagccat 11460
tctccatac ggcgttattc ggtcacacga ggctgaatga atcaaactg aatatcaatt 11520
ggctgtatca aggtgaaacc gagtttttca ctccgattgt tcttgctg ctccggtgaag 11580
ctgctcctaa aggaacaac cgaactgccc catccaggta aacttcgatt gggggggggg 11640
tttttttttt ttcaagggtg actggaagag tgctctcggc cacaaaatcc cagaagcatt 11700
agtgtgttta ttcgattata aaccgtcgca gcgctctcat tcttcgctct ttcttctttt 11760
ccactgggtg gcataggtec tatctgtctc acgcaatgct cggccagggt cttctgaccg 11820
tcgaatcgta ccaatgggta tcgaccctc aagcccttgt ggccggtcgca gtgcttctta 11880
gtctcatcgc ctaccgtttg cggggggcgcc agtcgaact gcaagtctat aatcccaaaa 11940
aatgggtggga gttgacgacc atgagggtta ggcaggactt cgatacgtat ggtccgagct 12000
ggatcgaagc ttggttctcg aaaaacgaca agccctgcg cttcattgtt gattccggct 12060
attgcaccat cctcccatcg tccatggccg acgagtttcg gaaaatcaaa gatattgtgca 12120
tgtacaagtt tttggcggat gtatgacctc tgaattttcc attgttgtaa ctcaatgacg 12180
tctctaagat tctgatgaat gtataggact ttactctca tctccctgga ttccgacggg 12240
tcaaggaaat ctgccaggat gcacatcttg tcaacaaagt tgttttgaa cagttacaaa 12300
cccaagcccc caagtacaca aagccattgg ctacctggc cgacgtact attgccaaagt 12360
tgttcggtaa aagcgagggt aagtgtcaat tttctgtct tgagcattga gcctctggct 12420
gacataccgc gaatatacta gagtggcaaa ccgcacctgt ctattccaat ggattggacc 12480

ttgtcacacg aacagtcaca ctcatatggt tcggcgacaa aatctgccac aatgaggagt 12540
ggctggatat tgcaaagaac catgccgtga gtgtggcggg acaagctcgc caacttcgcg 12600
tatggcccat gctactgcga ccgctcgtc actggtttca accgcaagga cgcaaattgc 12660
gtgaccaagt gcgcgcgcga cgaaagatca ttgatcctga gattcagcga cgacgtgctg 12720
aaaaggccgc atgtgtagcg aaggcgctgc agccgcccc a gtacgtcgat accatgcaat 12780
ggtttgaaga caccgcccgc gcccgctggg acgatgtggc ggggtgctcag ctcgctatgg 12840
atttcgccgg catctacgcc tcgacggatc ttttcgtcgg tgcccttggt gacattgcc a 12900
ggcaccacga ccttattcag cctctccgcc aagagatccg cactgtaac ggagaagggg 12960
gctggacgcc tgccctctctg ttcaagctga agctcctcga cagctgcatg aaagagacgc 13020
agcgaatcaa gccggtcgag tgcgccacta tgcgcagtac cgctctcaga gacatcactc 13080
tatccaatgg cctcttcatt cccaagggcg agttggccgc tgtggctgca gaccgcatga 13140
acaaccctga tgtgtgggaa aaccccgaaa attatgatcc ctaccgattt atgcgcatgc 13200
gcgaggatcc agacaaggcc ttcaccgtc aattggagaa taccaacggt gatcacatcg 13260
gcttcggctg gaaccacgc gcttgctccg ggcggttctt cgctcgaag gaaatcaaga 13320
ttctcctcgc tcatatactg attcagtatg atgtgaagcc tgtaccagga gacgatgaca 13380
aatactaccg tcacgctttt agcgttcgta tgcattccaa cacaagctc atggtacgcc 13440
ggcgcaacga ggacatccc ctcctcctatg accggtgcta agatataaca cgcaactaa 13500
aacaatatg catccgtccc caggcttatt ccaatagttt ccgtcccaga gaaactaggt 13560
gctgtattag tcgagtaggt tagtaaaata aaacgcattt tattcgattg tgatgccttc 13620
tttgtaatcg aacgtgggtg agactttggc tatgtgcgag agacagaaac acagagagag 13680
agaagggaga gagtgtgtat tctgtctacg cagagcgccc atctgcttct ataccgccag 13740
ctacaccgcc acgtaggga gtcggcagta atgaagctt tctcccggt caatcaccga 13800
tctccccatt ctctcaggcg ttgactggcg cttacgatga cgagggetta ggctctgtta 13860
agtcttgatg ttctactca acatccccga ctaggcgaaa gagaggacgg cgcaacgacg 13920
tggaacaaag tactccctcc cgccttcga ctacatatcc acaatctgta cccactgccc 13980
gtgccaaacg ctttcgaccg ttcaacgcgc atttacaagg cttgcgggaa tcataatgga 14040
gagaaaaaga gagaactttt gacagtcaag cctccgaggt gctaagacag cttccctggt 14100
agtataaaaa gcattcactc ttccgacttc gagaacgagt gcacatgtgt actttgttgc 14160
ttctcagggc cactgtaatg gtatttcagg tatctctatt tactgctatc cagaagtcag 14220

gcattaaata gtcaggctca gccagggctc gattcagatt ggattcaggc ttcagaccat 14280
ggcggctatg ctccctcgta ctatacctcc gtcgagctat acccgcttgg ccagacaaaa 14340
ggcttcactg aacccttcaa cttaactgca tttcgccaca actaactcga cgaggccggc 14400
gatgggtgta ccattcatga gctcaaagat cgacacatca acatggattt cagatgtgat 14460
ccagtttcga agttcaatgg cgacgagtga gtctacgccg acacctgcca ggtttttggga 14520
cgaggacatg tegtcttctg ccagaccaa cttcgcac agcttttccg tcattgcttt 14580
gaggacgata gaaatggcct cgctgtgaga ggtgacctg cttagttggg ccgcacgcc 14640
atctggtcct tttttatgcg aagagacaaa ggattggctc gcatgaagga cttggcggtga 14700
tttaagtccc acaaaccgct gttcctgtat ccagtttgcc tcgggtccagt gagcaccgg 14760
ggatgtgttg attcctgtaa ccacagctgc gggagggtgat ggaaattgag gggaagaaca 14820
caggattgcc ttctccaaca catccatgac gtccctttca tgcataggct tgtaacctat 14880
tctagcgagc cggtcggcca caccacggcc agtttcagcc acgtatccaa cagacttgac 14940
catgcccag tcaatggtga cagccggcat gccatgggct ctccgggtgt gcgcaagtgc 15000
gtcctggaat gcaccagcag ctgcgtaatt ggctggcct gcccaccca tgaccccaac 15060
aagggatgag agcatcacga agaagtcaac atcctgtgcg atcttgtgaa gataccaact 15120
accctgtact tttgggcgtg ttgctgcatt aaattcatcc aatgtcattc gcgatagaag 15180
cgcgtccttg agaaccatgg caccttgtat gatacctcga attggcggtg catgtgcttc 15240
ttcgcaaac cggagcacct tggtgacctg atcttgatct gagatgtcac atgcgtgtag 15300
atagacagcg cactgttgat tttgcaagct ggttatgaat ggactggcct ttgcatttct 15360
cgataggata atcaagtgtc tcgcgccatg atcaacaagc cactgacaga tctgctttcc 15420
aatcccccc agcccaccag caactaggta agaactgtca ggcttcagct tcagcgagaa 15480
ccctccatcg ccgactggga ccagttcgtc ccagataca ttgaccacaa ctttgccaac 15540
atgtgacca ctctgcatcg tacggaagge cttctcgatg tttgacaagg agtctgtctg 15600
gattggacca atcaagccaa tcgcttttgt ctcgaggagt tttgtgacat ggttcaacgc 15660
ttcgatact tcttcacttt tggtcttttg ccacgagaga agatcaattg atgtgaaaga 15720
gacgtcccgg gtgaatggca gcatgtcaag tctgtgttt tgctccaggt cttttttcc 15780
aatctcaaca aatctgccga attcggccat gcagtcaaag cttgcttgga ggagttgacc 15840
tgccaatgag tttagaacga catgaacgcc aagtcgccc gtgtaggctt tgatgccgtc 15900
gacgaataag tcattcctgc tcgagaagat atgatccgga ttgatgccga atttatcgcc 15960

gacaaaagtca cgcttggctt gagttccgc tgtgacgaag acctcggcac ccgcaagctg 16020
ggacaaaatg atcgtctgctt gaccgacgcc tccagctcca ctgtggatca agactctttc 16080
gcctcgtcgt agctttgccg tgggtataaag cgcaatatat gcggtagtga aagccagggg 16140
gaccgaagcg gcttctggga agccatttc gtccggaata cggacgacat tagtgtacgg 16200
cgtctgtgtt ctggtcgccc aatggccttt cagtagtgca catacgcggt ccctaattct 16260
gaggccttgg ctacggcag cagctccacc gagctttgtg atcactccgg cgcattcgaa 16320
gcccatcaca cggttggcct ccaattgacc catggcaacc atgacatccc gaaaattgag 16380
accgaaaget ttgggttcga tttctacca atcatccga agatccttgc cttcacgtcc 16440
ttcgtcgtct cgaaattgca gggagtctaa gaggcctggc gtctcaacct ccatccgcag 16500
acgacgcccg ggttgctcga acggctgcag tgtgacctca accgcttctt ggtccttcca 16560
gtgcgggtca ttgaaaagtc gcggtagtg gatgacgccg tttctctctg caaattcaaa 16620
ctccttgtct tcggaaaggt cggcgaggcg gccattgaag atattgcaga tagcatacag 16680
ggactcgtgg gtgtatgctt ttcgagaagg atcgagatcc aacgatacat attccttccc 16740
gttattttcg ttgcggatgg tacgcagcag accaatatgt agagctttcc atggatcctc 16800
ggagctcatg gctgtcctc tagacacca gagaagtgcg ttgcagttat tcagcatcgc 16860
ggtgatggat ttgaaggctt cgcttccac ctctccaagg agcgaggact ccatttcccc 16920
aagaaaaatg catgtccttc cagtggatc tacctgccc agagcgttga tcgatgggct 16980
agaactggtc ttttcacaaa ttgtgcctg gagactttcc agccaagatg aaggaggtcg 17040
gagcgtccg tgcagcaaaa gcacctcga ttctgccact gtatccgggg ttgtattctc 17100
ttttctagcc gtcgatagca ttgtgtgat catgtaaaac tcctgtctt cacaatcag 17160
aacctccaat tccacaccgt tgaaaccgt cgtgtccac atggtgttcc aaagatcgg 17220
agtgagcgat ggcgtcgact tccgtcagg ctctcactg agccaccaac ctggcaacag 17280
tccgaaggta aagaacaaat cgagctgac cctggtagtc tcaacaaaa tcaagttgcc 17340
cccaggcttg agcaattttc gaacgttact cagtgtcgt ttcatgcac gagttgcatg 17400
caggacctgg caagccacga ccacatcgt ggtggcacat tcaaaccctt gttgctcggg 17460
atcgttttca atatccaatt ttttgaaagt catcacgtct tgccaatccg caaattgctc 17520
acgcgccgac tcgaaaaacc cggcagacac atcggatgaag tcataacgat cgatcggctt 17580
ggtgtttccc aatgcattga caataagctt tgtgcagccg cccgtgcctc cgccaatctc 17640
caaatgcga gaacgcgggt tcttgtgggc gaaagtgcg atcagctgc tggttgtgc 17700

gtttgatcgg ctccatttga ttgcgttgac gtagtatctg cttagcagct gatcttgcac 17760
catcaactca agtggctctg tttecgggcg tagcattgct attaactgag gtcctagacg 17820
agaaatcacc tcgccattga cgctttctcc agcgactctg gcctgtaggc atttcttctg 17880
ctcagcatcg tcacttagcc agtcgcaact ggctgggctg agcttgtttt gtctcgcaag 17940
gtccaattgg acattcatcc aatcgaaata cttctgaagg tggccatcca gatgttggat 18000
atcagaattt gtcaaatcag tgacagcctc ctgtataaag ttgatcgtgc atcttcggag 18060
gtccatcatg agttccgttt ctttcgtctc agcctcagtg ctcaactttt ctttgagcca 18120
agtggagtca cccaagctga tgtcaggggc ccaaaccag gagctgcagg cattttctgt 18180
gtcgttggag tctgactttt ggctagagaa gctgcttcca accgactgga aaacaaggcc 18240
ttcaatctct atgactggga ttccgtccga gggagaagaa ccgctatcat agtcatcaaa 18300
cactgccaaag tcggtagaga aggattgaga gttgcgatcc ttgatgctgg cctgtgcgtc 18360
cagagcatca ccagcctcca agtcagccag gctagaggat atttgacat ttcttagcct 18420
ccttggtacc atggccgttt tcatacgtgt tcccgctag ggtaacaccg tgtatgccgc 18480
ctggatcacc gagtccagag tagtaggatg gacgatgtgt cgattctgt acgagtgagg 18540
catagccgag gcagtgtcag caatggaaaa tctgcaaac gagccctgtc cattgttttg 18600
aatcgtctga atgttctgaa aaatgggtcc gtggcatatc ccattcgcgt gtaaggactc 18660
ccagagatcg ttgggatcaa tgctccggtt atctgagcct agattcaacc tgcgtgaggc 18720
ttccacagtt gaacagtcaa ggtggcttct ttcgtctctc gaacgtatta atccggtgca 18780
gtgttctgtc caggtattat ttctgcccga aattgagtgc acagaaaatt gatgccagtt 18840
ctttgtgccg agggacctt cctcacatga acggatcgtt aggcgcaggt caacctctgc 18900
ttctgcatca ggggtatta tgagagcctg cgcgagttca acgtcacga agttgtagtt 18960
gatgctagcc cccgcaactg gtgggcagac ttgtgaaaac ccctcgatgg ccattgctgat 19020
gaagccagct cccggaaaga tgatgctga accaacgacg tgatctcgta tccatggaat 19080
atctgacaga cggagaacat gtttccattt aggcgcgaaa tgaggagaga gagattcccg 19140
tgagcctatc aaagtgtgag gcggatgggt tctctgtttg gactcacgac tgccgcgagg 19200
ctctctccaa taacgggttt ggtgattcca cgggtacgcc ggcaaatgc tcagtacctt 19260
cactctgggc tcttttcttc catgaggaaa gtttatagcg tccattttga gcccataacc 19320
cttgcttacc aactccgtag cagcacgata cattgtctcc aacgagcttc tgccgcgaga 19380
aaggcaactg agatagtta tatctgttcc ttccagacc agatcctgca tgacttggtt 19440

gattggacca ccaagcgctc cgtgaggccc tatttcaata atcacatoga cggctttctc 19500
tttgggtgttg ggatcaaagc acatctcgcg gagtgaggac tcgaactcta cggctgttag 19560
catactatcc atccagtgtg tgggatccaa tagcaattta agatcgggtca tgcgactacc 19620
agtcttaggt gatgaatata atacaccctt tgagggtgtca gcattgggat tgtcgttggt 19680
gttatccgag ttgaacagat ctctcagtga cgcccaaag gcacttgcca ttggctgcac 19740
gtggcttgaa tggaaggett cagtgaactt cagtttctct gtaaagatgc catcggcgtg 19800
taacaacttt tcaagtttct cgattgcacc caaatctccc gacaccgtca cactacattg 19860
actgttgata catccaacca ccacacagcc gtcctcctgg ttgagacgag aaatgtaaac 19920
attgggtctca ctgcgaccaa gaccacccgc catcattcct cctttggctg ccaatgcggg 19980
cttgggctta gtggtcaata caccgcgtat ataagtgat ccaatggccg accgcgcgga 20040
taaagcccca gctgcgtagg cagcagcagc ctctccactt gagtgaactg ttatccccgt 20100
tgccgaatt ccccatgacc aaaggagacg cacaagtga atttgatag cggttgacag 20160
tggtgactg tattcgcat catttaccg agtcgtcagc tcacacggt ggagctcctc 20220
tgtcaattg aatgttagta cctcaagctt gatacagtat tacttttccc gggctcgcaa 20280
cttaccata aaattccaac tcgcgccag ttgcttgatg tagccatcac attcaagaat 20340
cgctgtttg aatactggga atgtattgac cagctctctg cccattgcat gccactgcgc 20400
cccctgaccg gtgaatacaa atccgagccg tacttttctc ttcgtcgtt ttggttgatt 20460
ggactcatcg ctgagggcag aaacaaggcc gccaaaggctg tctgtacat aactgacgt 20520
ccatggcaga atggaacggc gagagcctag tgtataggcg aggctggcga ggaagggttc 20580
ccgtcaatg tcagcgacgg atttaagtga gtctcgcagg cttgtatcg ttgcgcgaca 20640
agcttgctcg tcttggcac gcacaacgta tatgcggctc tgtttggaac catcctcaac 20700
cctaccatgc tcagagttac cattgacatg cacttgatcc tctggcaggg ccaatgatgc 20760
gcgatcatat gattccaaaa tgacgtgagc attcgaacca ccaaagccga agttattgac 20820
agatgcgcga cgagtcccat ctttcacagg ccagttctga gcagacatgg ggatctttga 20880
aacattaacc tttgaaacat ataactgaat ctgcgaatgc gcaaagcctt accttgatgt 20940
tcttttggtc aagcatcagc ttgtgtttct tttgcaggaa ccgcgcatta gggggaatca 21000
agcccttctc caaggccaag gccaccttga ttatactggc caggccactg gcggcttctg 21060
tatggccaat atttgcttct acagagccaa ggtgcagagg atgtccttta aaagctgctg 21120
aaattgctga gatttcaagg gggtcaccag ttgggtgttc agttcgtgg gcctccactg 21180

acgagggtcaa cgacatatct agcccagcct tatcgtaaca ctccctggatc agacttttct 21240
gcgccacatc actcggcgca gtaattgogg gtgttttgcc atcctgggtc agcgtgtct 21300
ctcgaatgac ggctcggata gggctcttggc ctcgcaacgc gttagggagg gcctttatta 21360
ccagagcggc aattccttcc ccgcgacat atccattcgc tcgaggatca aaagagtacg 21420
agataccatc cggggacaaa aatctgtcat tgagcaacaa ggattgctta gttcaagact 21480
ctcgatctgg aatcttcttc ggaaaactca ccccagggtt gacatcgtaa caaaaacatc 21540
gggattgagc agaagatttg caccgataac gatggctgta tetgactccc cagtacgtaa 21600
gctctggcac gccaaagtga gtgcgggtcaa tgcgtcgaa caggccgtgt caaccgtcac 21660
gctgggacca cgtaagtctg agaagtgtga tatccgggtc gaaagcattg ttcctgagtt 21720
gccagttatg aaataacgcg gaactgtctc ggggtcacga ttgagcgaat cctgatagtc 21780
gtggtacatg acacccccaa acaccgacgt attagagcct gccataccat cgatggtgat 21840
accggctgga tgatggtcag tgacgtttgc ttacagttag gatgaccac actacatacc 21900
actctccagc gattcgtaga ccacctcaag cataagccga tactgcggat ccatgcactg 21960
tccaatatta gatctctgcg tcccgggtta gatcaattga aataatcata cgctggcgac 22020
ctctgtggtc atgttgaaga acgcggcgtc aaataaagca ggatcctcgt cgatgaagtg 22080
tccaccttt acgtgggtct atccagtcct ccttggagtc agtaaccaag cttcagtgtg 22140
gctcaaactt tgtgtcaaat attcaaaaac agatataaat gcatgcatgt tagatactca 22200
cggacccgac cctttcgcca ttccgggtgt atactctct cacttgaat cgcgaggagg 22260
ggaccttaga ccaggcactg cctcctcttt caaccatttc ccaaagcttc tgtggactcg 22320
ttgcatctcc agcaaatcga catcccatc caactatggc aatgggcgtg gatgtgttag 22380
agcaagccga gcctgccatt gcggttgogg ttgcggttgc ggttgcggtt gcggttacgg 22440
cgggggtatt gttcattcca acgttgtttc attgactgat atatcagtcg cctggtgat 22500
aaaaccgttg atagtcttcc aacagtctac aggtccctgg catagctata gatgcataag 22560
ctgccccga cactgattc atagttcggg gtttgttttc atcttggacg tgacacgata 22620
ttcgctctgt gcccatggga aaccccgga caccatgcta tgctcggggc aataccttag 22680
aggtaaccgt tcgggaggca ttgtctgtcg tcacgataat cccgagtcaa aacgccgatg 22740
ggaaaccgtc gaacaagacg aaacagggtc ggccggccag gtagttttcg ggtataatgg 22800
aggctgtcag aatccgatac tccgtacaca gatgcgaaat acgcatacga gctatcaaac 22860
caaacgaatc caaaagcctt ggaaaagctt ggaaaggett agtgggtaat cctgtcccaa 22920

ggtttgttga gggcctgagc gcaggggtggg tccgtgaagc agttggtaat tcaatttcca 22980
acaatacaca atccccaaaa ttgtcattat cggttgacta agacaagcaa acaaaatata 23040
tgcaggaagc gcaattcatt gcgagcaaac gatcatcatg agcatgtgac cctttcctct 23100
tttttctact tcggaaggcg gcatgatcat ctgtcagaac tcccaatcgg gagcaatacc 23160
ataccttacg gcaccccaact cagacccatg cacaaagaaa atccatgcgc cgaatattga 23220
agccttggca acaaagcccc gtgtaactcc gaaggtatcc aaagaccgag agacgcgat 23280
ttgagagaca cgtacggagg tccacacaaa atgttcccg gtctatacac tatactccaa 23340
actgacttct tgtctacctg ggtatcttgt tcaggttgct gtttactgag ataaatgata 23400
ccgggggggg gggggggggg ggggggtgac actggctttt cgtggacaga ataataccca 23460
tacatccctg cgtaagtagt cgtttcgaga agaattgtgt tcgtgggtgca ttactccgta 23520
ggcacaatat atttccattc ctcacgaagt ggcctcgtcc gggcgtgatc gatgcagctt 23580
gccgcccac caaaaagga ccacaatac agtcagatta gaaacgtcta acaggacgtc 23640
tatgtaagag gacgtcctt tgtatgtcgg atctaggcat gacaaaataa ctatacctag 23700
gtagtgttct gtcttattgg tcatttgccc tactttcgga acaatcttgg aagttcacat 23760
tcttaggtat cagggaatt gattggtgtc ccagaattc tttttctcg aataaaggat 23820
aaatttatgc ataaaaacct tggaaactga gcatagttat gagcacaat actagttttc 23880
agtgaattg gtcctactat cctttgcttg gtaccctta ccaattatac cctaggcagc 23940
agttgacacc ggtcatgaat ccattcataa aggtggacca gatgcaggga taaggaagcg 24000
aatctttcgc ctgcctcagc ctcagggcg cgcgccattt gttattttct tctactcatt 24060
tcccgtaact aggaactgtt cagttgtccc tcccaacccc ttgggcccga caaccttct 24120
ccaatctacg acggcagatt atacctaggc gcctaaccga ttaggttgct cattcgattt 24180
tggaggtatg cactttatct caagccctaa tcccaattg aagtgtttt cgtccccat 24240
ttgcagagct gactagattc ttttctcaga gactacctag ctataggtac cactccaagc 24300
tgtagcacag acctttcagc atggctcgtt cgttgctacc ctctcgttt cgcggtaggg 24360
aatcaatgaa tcagcagcac cctctacgt cgggaaatcg ggcattgacc tccacactcc 24420
aatttctatc caaaacggcg tgtctacacc cgatccatac cgtttgcacc atagctattc 24480
tagctagtac cacatacgtt ggactactca aagacagctt cttccatggc cccgcaaagc 24540
ttgataaagc agaattggggc tctttggctg aaggaagtcg aagcttgatc accggcccac 24600
agaatggctg gaagtggcag agcttcgacg gggatgcaga tgttctcgga gatttcaacc 24660

atcaagcact aatgaccttg gtattcccggt ggtcatatgg ggttgcatct caagcagcct 24720
caccattcct tgctccccctc cctgtgaacc tatctgtgat tgaccttccc tcaacgtcga 24780
gccctttaac cgcctattcg aaagataaag ttttcgcctt ctctgtggaa tacagcagcg 24840
cgccgggaact cgtggctgct gttcaagaaa tccccaaaca cagtgcgcgac ctgaaattgc 24900
aggagacgca attgatcgag atggaacgcc agatgtggat catgaaggct gccagggctc 24960
acacaaaacg cagccttgct caatgggtgc acgatacctg gacagagtct cttgatetta 25020
tcaagagcgc tcaaagctc gacgtgggtg tcatgggtgct aggttatata tcaatgcact 25080
tgactttcgt ctactcttc ctacgatga aaaaattggg atcgaagggt tggctggcta 25140
caagcgctct tttgtcgtca acatttgct tttctctcgg tctcgacgtg gccataagac 25200
taggggttcc gatgagcatg aggttgctat ccgaaggcct ccccttcttg gtggtgatcg 25260
ttggctttga gaagagcatc actctgacca gggctgtttt gtcctatgct gtgcagcacc 25320
gaaagcccca gaagatacag tctgaccagg gtagcgtgac agccattgct gaaagtacca 25380
tcaattacgc cgtacgaagc gccattcggg agaagggtta caatatcgtg tgccactacg 25440
tggtcgagat cctgtccta gttatcgggt ctgtcttagg catccaaggt gggctacagc 25500
acttctgtgt tctagctgca ttgatcctgt tctttgactg tctgtgctg tttacattct 25560
acactgcgat tctgtctatc aagctcgagg taaaccgcct caaacgtcat atcaacatgc 25620
ggtacgcgtt ggaagatgag ggtctcagtc agcggacggc ggagagtgtc gcgaccagca 25680
atgatgcca agacagtgc cgtacatata tgtttgcaa tgatatgaa ggcagcagt 25740
ttccgaagtt caaattctgg atggctgttg gtttccttat cgtcaacctc gtcaacatcg 25800
gtccaccct tttccaagcc tcttctagt gatcgttgte cagtatatca tcttgaccg 25860
aaagtctgag cggatcgcc attaaacccc cgttgagcc cttcaaggta gctggaagt 25920
gactagatga actacttttc caggcaagag ggcgcggta atcgactatg gtcactgtcc 25980
tcgccccat caagtacgaa ctagagtatc ctccattca ccgtgggtacc tcgcagctac 26040
acgagtatgg agttgggtgga aaaatggctg gtagcctgct caccagcctg gaagatcccg 26100
tcctctccaa atgggtgttt gtggcacttg ccctaagtgt cgctctgaac agctatctgt 26160
tcaaggccgc cagactggga atcaaagatc ctaatctccc gagtcacca gttgatccag 26220
ttgagcttga ccaggccgaa agcttcaacg ctgcccagaa ccagaccct cagattcaat 26280
caagtctcca agctctcag accagagtgt tcaactctac caccaccgac agtgacagt 26340
atgcctcatt agtcttaatt aaagcatctc taaaggtcac taagcgagca gaaggaaaga 26400

cagccactag tgaacttccc gtgtctcgca cacaaatcga actggacaat ttgctgaagc 26460
agaacacaat cagcgagttg aacgatgagg atgtcgttgc cttgtctttg cggggaaagg 26520
ttcccgggta tgccctagag aagagtctca aagactgcac tcgtgccgtc aaggttcgcc 26580
gctctatcat ttcgaggaca ccggctaccg cagagcttac aagtatgctg gagcactcga 26640
agctgccgta cgaaaactac gcttgggaac gctgtcgcg tgcatgttgc gagaacgtta 26700
ttggctatat gccagtcctt gttggcgctc ccggtcctat tggtatcgac ggcaagagtt 26760
atttcattcc tatggcaacc accgagggcg tctcgtcgc tagtgctagc cgtggcagta 26820
aggcaatcaa cctcgggtggc ggtgccgtga cagtcctgac tggcgacggt atgacacgag 26880
gcccgtgtgt gaagtttgat gtccttgaac gagctgggtc tgctaagatc tggctcgatt 26940
cggacgtcgg ccagaccgta atgaaagaag ccttcaattc aaccagcaga tttgcgcgct 27000
taciaagtat ggggacaact atcgccggta ctacttata tattcgattt aagactacta 27060
ctggcgacgc tatgggaatg aatatgattt ctaagggcgt ggagcatgca ctgaatgtta 27120
tggcgacaga ggcaggtttc agcgatatga atattattac cctatcagga aattactgta 27180
cggataagaa accttcagct ttgaattgga tcgatggacg gggcaagggc attgtggccg 27240
aagccatcat accggcgaaac gttgtcaggg atgtcttaa gagcgatgtg gatagcatgg 27300
ttcagctcaa catatcgaaa aatctgattg ggtccgctat ggctggctca gttggcggt 27360
tcaacgcccc agctgccaat cttgcggcag ccattttcat tgccacaggt caggatccgg 27420
cgcaagttgt ggagagcgct aactgcatca ctctcatgaa caagtaagtt gaaagcggcc 27480
gcttacttgg aaacattcac taatcctgtt tagtcttcgc ggatcgcttc aaatctctgt 27540
ctccatgccg tctattgagg ttggaacgtt gggcggtggt acgattctgg agccccagg 27600
cgcaatgctt gacatgctt gtgtccggg atcacaccg accactccg gtgagaatgc 27660
acgtcaactt gcgcgcatca tcggaagcgc tgttttggct ggggagctct cgctatgtgc 27720
tgccctagcc gccggtcacc tggtaaggc gcacatggcg cacaaccgtt ctgccccggc 27780
atcttcagcc cttctcga gtgtctcccc gtcaggcgga accaggacag tcctgttcc 27840
taacaatgca ctgaggccga gtgtgcagc tactgatcgg gctcgacgt gattaggtcg 27900
gaatcttagg agcattccaa gctccgtacc cctccagtg gattcattgc aggaggatca 27960
tattttttct cattggttgt tattgtcata attttcaaaa gcacaatgca atgagacagg 28020
caggtggtag agtgaacggc cagaaagggt atctcatgtt tatatgttgt tgaaatttac 28080
gatgcaagta gtagggaaga agaatatata aagagatggt ctttttcag agagtgttta 28140

ggctctgatcc ctcataatta tttaatgagt gaaagctttg ttcaagctat aacttactga 28200
gtaggttgaa tgttgatctg attcattcct gaggtatcag gattgatgcc tgaacatca 28260
atcateccatt gtcagatgcc gtaactaact aactatgaat ctcaacatag ttatatgttg 28320
ccaatctagc cacggtgact agaaccttga gatggactta gactagacat gggtcgcggg 28380
caatgacata tagaatcttt gaaatcgaca ttaattaagt atgtggagat tctttgtgga 28440
ggcacggtaa tgtgtctatc tagcaacgcg gtcaagcatc agtctcaggc acagcccggg 28500
tgtcgttttt gggttgcaatc ttccgccatc ccattccaaa ggcaaacaca aacgtgcacg 28560
ccgtagctcc cactgctaag taaaaagtat gatcaacggc gagactgtaa gcttttacia 28620
cccctggaag gttattcttg ctgaccacat ctctgaagcc agtcgccctt gctgccgtca 28680
cggcctgcgt gtcgacagtg ggccgatact tgctcaggcc agttctcaaa ccggacccaa 28740
agacaagggt agcaaagtcc aggaagagcg atcctccaaa cgtctgtcca aacacggcga 28800
gagaaattcc gagggcacct tgttcggggc aaagcgtgct ttggatggcg atgataggct 28860
ggccattgag tattgatgtc agcgtctagc gggtgcatgc tcttcttgct ttgatacaaa 28920
gccgaaagcg tgagagatga tcaaagggtt catagcttac cgtttgcatg ccacaaccac 28980
gaccgaagcc cgcgataaat tggtagatga ccatttcac agttgatgta tggggctgga 29040
aggtggatac cagacctgcg cctatggcga cgagaacagc gctgcctagg gcccaaggca 29100
aatagtatcc tgtctttcca actgggtgcgt catatgtcag tatacacgat atccaagccc 29160
gatgtcagac gggtgtggca agaaaggagc catagaaatg gacgggggtg agaaaaatgt 29220
gtacgcgagt ttcacttact tgcgaagcca gaaaccatag ccataatgac ttgtccaaga 29280
attccaggca acatgtacac accactcagt gtgggagaaa catccttcac agcctggaag 29340
tagatcggta gatagtagga aaagacaagc aaggagccag agaaaaagcc cataaataaa 29400
caagagcacc aacttgtcg ttaccagcc actgagccag gaatcatggc aacagcatcg 29460
ccaacatgac gctcccatag cacgaacgca atcagagcaa accctccgcc acagaacagg 29520
ccgatgatga cggaacttcg ccagggttag gtcgaccctc ccattctag tgcgagggaa 29580
atcatgggtg cgaaggctgc aaagaccaca aagcctacaa ggtccagttt gcgaagtgtg 29640
gattttatgt tggccattgg tttgtcggtc gagagtctgc tgtccgtgga tgaaattcgg 29700
tcgggtatgg tgatgacgag aaggaggaat gcagcgacag cgccgatggg gagattgata 29760
taaaagcctg aattccaagt gagaacatgg acaacaatca taaaaggcc aaaggtcaac 29820
atacaccatc gccaaagtgc gtgttgagt aaagcacctc cgagcagtgg tccacagaca 29880

atggcaatct gactaactga aaacatattg tcagacgacg aaccgttcgt ttgggggtaca 29940
tcagatcttg agatgacata cgacccatca tcaactccat caaaacttca tatgcgaggt 30000
cagcgtgtac acggcaccca gcagacttcc aaaaatcggt tcccttacct gggttgcttgt 30060
gcttaggagc agctgttgag aggattgtga gggctccgtt gacaagacct gagcctccca 30120
ttccagcaac ggcccgccca acaatcaaca tgggtggaaga tcttgcgga cgcgatagca 30180
ccgagcctag ttcaaaaata cagaggaagg caaagaaagt gtacttcaag cccaagagtg 30240
tatacaattt accggccagg ggctggagag cacagctaaa tatgatgtta gctaattctgt 30300
tcgtacaatg aacaaggta aggagaacag agccatactt agccagaaga taagcaactgc 30360
cgtaccaccc tacatcgttc agagagtga actcgttgt gatatgtggg attgcctgtg 30420
gctggagtca attgactgtg ctgcgctctg ttctgaggta gccaccatct taccgtgacg 30480
ataatggaca tatcaaggag catcaaaaat gctacgaaag taactgaagc aaccaccage 30540
ccgagcttga ggccgtgat gtgctgggac ttggactcag tcgcttcgag cgtgtcattt 30600
tgactttctt ccttctgtgg ccttggttcc ccttcttttag ggggtagagg ttctgacatc 30660
ggcgaattcc ttccgacttt tgcttcaagg ggcggtgtga atctctactg cgcggcgctt 30720
ctatagtacc tgtgttttgg tgtatgaatg atctcgtctt cgttggttcg ttaagggtccg 30780
ctagcctgaa gtcagattga tggatgggga tcaggggaaa ttggcgacgt ctttaatttt 30840
gcttttcttt gttaccggaa gtgttgcggt attagcgtgt ctgggcttat ttacgacgca 30900
caagatgcat tgaactggcc ccaactgctag atctcactag tattgtgggt gtaatttacc 30960
tatactccat attgactggg caggttttga acacaacca cccccccca tactacacat 31020
tagttttgca tattttcctg ggggccaaaa aaacccaaa aggcttcaat attttgcggc 31080
caatggagag tgtaactaat ttggcccaca ctccggtggt atcaatcgga tctcactgca 31140
tatatgatga aagcaagagg gggcaggaga tacgctcttt attggctgtc tgcgcgaagc 31200
tgggcaaatg caaataaaaa gacaacaac cagctggaag accgggcgac aaacatgggt 31260
tacctaacac cctcgatccc aacaatgtgc atgttaatca atgtgctccg tggggagtat 31320
gaactataac atacgaagca gccattcatg tcaaaaaaaaa aaccaggcga atgggcgtcg 31380
tcaacggttt cacataagta ctatattgta ctaactacc gtgagactgg agagaacagt 31440
ctcgcgcgaa gaaacgataa gagcatcggt catatcggtc catctcggtc taagtgtatg 31500
agaatattcc gacgtgaatc catccgtcag tgatcaatgt ctccaagtaa ttcattcattt 31560
caattaccct cgttttactc cgtagaatac aagaccttac tagcgcaaac aagtgggggc 31620

taacgggtgtg atctccttcc gttgcggcgc ccacctcggt tccagccgta atacgacgac 31680
ccgtctatcg cgaccccccta gccttgcca tttttggcgt tacagtaaag ctttgagag 31740
aaacgccaaag ggaaaatgct agccaccaat tctataaatt actcttcaca tgcagctagt 31800
atcactggta agtctacggg gcacatgtaa aatTTTTtatt acttttcta atctttcca 31860
agttcttttc cacggggccc caatgcttaa aatactcaaa agacgtgaaa aacctgcaag 31920
ccgccagtga tatcacacgt aatgcctcaa cagcctgatt ccgagccatt atatgctgtt 31980
tgatgatctc aaattgagat ggcgagcgt ggatctggga aattggtagt gggattggt 32040
tagaaacgta agtgcagaag accatgtaat aagtacatat ggaggctatg tgatggccc 32100
atctagtttc ttcaatatag cgctgggtat aaaaaaagc aggggctttc tcagggtaat 32160
gtcgagtct acaacgagt gcgtccactg acagggaaa gcgagcgggg ctatgctacc 32220
ttcaatttc atagaggggg gatgcacat ctccgacaat ctatagttac tcaaacagg 32280
acggtactaa gcaatattgt gttcttcgc taatgcgaat atttccttat agcaacgtcg 32340
caacacattt atcgtcttcc ctgaggcctt tgttgacttg ggctcttcgt ctccggcttc 32400
gtcactccaa agcacagata ggagacgaga ggccggcgtt atggttttat tttcagcgcc 32460
aaggatttgc cacgatgtgc ttggcatatc tgataggacc tattccccct ctcccggtca 32520
gcgcattgct gatgtatgca agggaagaaa agactgggtg ttatcggctc cacttactag 32580
acgaatagat gccgcagccc cgtgctcctg tgctatcccc aaagcagtct caatctcact 32640
caatagtcga aggtttacac gcaatgtcgt gcatgcagaa gataaggcgt gcatgaatgg 32700
gtcgagatgt gaaatgagct cgccgatatg aagattagag tgaaacgagg gaagtgttc 32760
ggctcttcca ttgtcatttc tagtggttga gccagaccag taccaatcca ttcgtgtgct 32820
ttgcttttgt ccacaagggt gggctttcat cacctcggt agtagcagct gggaaagtga 32880
tgtcatgatt ttgacagaca acatgtagca atgcaccgcc atgaacaagt tcttggtttg 32940
cagacaccca tctaactgc tgctattgct gctcgtgatc acacgttctt gaagatgtag 33000
tagcaatcta ccaaaggcat tcaaaaagtc cctatcggt tctaggaaga agctttagcg 33060
acaatcaaga ggcagtaaag aggcagaatt gaaaatctca cagcttaaaa ttttttgc 33120
gggccattcc acagtcaccc cgtggagtat tacctctagg tctgtgaca catccgacag 33180
actttcgaaa aggtctcgtt gcgtgttgc ttgtgttgat tgtccggatg acgagttccc 33240
ctctacttcg aggtcaaaca gcgatggcga gacaggcgcc gttgcatcca aagggccttc 33300
aaagtcgtag cctagatctg gtatccccga agattcattg ctgttggtat cgtcgcgaaa 33360

tgtatttggc tgaggccagc cgccgggaaa cgactcggga tcatcaaagt tgattgatgt 33420
atcatagaat tgcagggttg ccgctgatgg ttctgataat gtttccttga gtgccgaggt 33480
gccaatatgc gtaggtgggtg agcagtaagg tggaggagtc tctgccaatg atgagaagac 33540
cgtagaagat gtcgcggtca tcggttgtga ggtttctgtg gctctttag ttccagctgc 33600
ggcttcttta tgtaaattgc gcttgggtag cctttegctg tacacacacc ttaatccggc 33660
ttgttgacaa cgttgacact gacacggac taaattggca ttgctaccgg tacatttgag 33720
cttttgtgca tgacaccggt cacatgagcg tcgaaacgcg cgacggcgta ggctcgctcg 33780
aatcggtgca tgcggcaggg acataattat tggattaaga tcaaataatg tgaggtgaga 33840
ctttgcatgt tcttgatct ttatgtattg gaattggaga gtaagctcgt gcaggagata 33900
agttcaggtc gtcttgctgg aagacttact aagttatatg caaacaagtg ttttcgagcg 33960
gacacaaaa gccaatagtc ttactatgaa tgtcttttca gtcaccgga gaaatactct 34020
tagcctctgc tcttatgca gctcatcaa gctgggcata catacccat ccagcgccac 34080
gtattacact agaaagagtt ctaaaagaaa tagattcggc ccccatctg gctatcatat 34140
atgccagatg aaatacctgt aacgtggggc ataaaaggc aggctctagt ctaccagcag 34200
atc 34203

<210> 2

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 2

gatctgctgg tagactagag cctgcctttt tatgccccac gttacaggta tttcatctgg 60
catatatgat agccagatgg ggggccgaat ctatttcttt tagaactctt tctagtgtaa 120
tacgtggcgc tggatggggt atgtatgcc agctttgatg agctcgcata agagcagagg 180
ctaagagtat ttctccgggt gactgaaaag acattcatag taagactatt ggcttttggt 240
gtccgctcga aaacacttgt ttgcatataa cttagtaagt ctccagcaa gacgacctga 300
acttatctcc tgcacgagct tactctccaa ttccaatata taaagatcca ggaacatgca 360
aagtctcacc tcacattatt tgatcttaat ccaataatta tgtccctgcc gcatgcaacg 420

attccgacga acctacgccg tcgcgcgttt cgacgctcat gtgaccgggtg tcatgcacaa 480
aagctcaa at gtaccggtag caatgccaat ttagtccgtg ctccagtgtca acgttgtcaa 540
caagccggat taagggtgtgt gtacagcgaa aggctaccca agcgcaattt acataaagaa 600
gccgcagctg gaactacaag agccacagaa acctcacaac cgatgaccgc gacatcttct 660
acggcttctt catcattggc agagactcct ccaccttact gctcaccacc tacgcatatt 720
ggcacctcgg cactcaagga aacattatca gaaccatcag cggcaaccct gcaattctat 780
gatacatcaa tcaactttga tgatcccgag tcgtttcccg gcggctggcc tcagccaaat 840
acatttcgag acgatgccaa cagcaatgaa tcttcgggga taccagatct aggctacgac 900
tttgaaggcc ctttggtatgc aacgggcct gtctcgccat cgtgtttga cctcgaagta 960
gaggggaact cgtcatccgg acaatccaac acaagcaaca cgcaacgaga ctttttcgaa 1020
agtctgtcgg atgtgtcaca ggacctagag gtaatactcc acgggggtgac tgtggaatgg 1080
cccaagcaaa aaattttaag ctgtgagatt ttcaattctg cctgtttact gcctcttgat 1140
tgtcgctaaa gcttcttctt agaccgata ggggactttt tgaatgcctt tggtagattg 1200
ctactacatc ttcaagaacg tgtgatcacg agcagcaata gcagcatgtt agatgggtgt 1260
ctgcaaacca agaacttggt catggcgggtg cattgctaca tgttgtctgt caaaatcatg 1320
acatcacttt ccagctgct actatccgag gtgatgaaag cccaaccttg tggacaaaag 1380
caaagcacac gaatggattg gtactggtct ggctcaacca ctagaaatga caatggaaga 1440
gccgaagcac ttccctcggt tcaactctaat cttcatatcg gcgagctcat ttcacatctc 1500
gacccattca tgcacgcctt atcttctgca tgcacgacat tgcgtgtaag ccttcgacta 1560
ttgagtgaga ttgagactgc tttggggata gcacaggagc acggggctgc ggcattctatt 1620
cgtctagtaa gtgggaccga taaccaccag tcttttcttc ccttgcatat atcagcaatg 1680
cgctgaccgg gagaggggga ataggtccta tcagatatgc caagcacatc gtggcaaatc 1740
cttggcgctg aaaataaaac cataacgccg gcctctcgtc tctatctgt gctttggagt 1800
gacgaagccg gagacgaaga gcccaagtca acaaaggcct cagggaagac gataaatgtg 1860
ttgcgacgtt gctataagga aatattcgca ttagcgaaga aacacaatat tgcttagtac 1920
cgtacctgtt tgagtaacta tagattgtcg gagatgggtgc atccccctc tatggaaatt 1980
gaaggtagca tagccccgt cgcttttccc tgcagtggga cgccactcgt tgtagactgc 2040
gacattacce tgagaaagcc cctgcttttt ttatacca gcgctatatt gaagaaacta 2100
gatcgggcca tcacatagcc tccatagtga cttattacat ggtcttctgc acttacgttt 2160

ctataccaat cccactacca atttcccaga tccagcgctc gccatctcaa tttgagatca 2220
tcaaacagca tataatggct cggaatcagg ctgttgaggc attacgtgtg atatcactgg 2280
cggtctgcag gtttttcacg tcttttgagt attttaagca ttggggcccc gtggaaaaga 2340
acttgaaaag attattagaa agtaataaaa attttacatg tgccccgtag acttaccagt 2400
gatactagct gcatgtgaag agtaatttat agaattgggtg gctagcattt tcccttggcg 2460
tttctctcca aagctttact gtaacgcca aaatggcca ggctaggggg tcgcgataga 2520
cggtctgtcg tattacggct ggaaccgagg tggcgccgc aacggaagga gatcacaccg 2580
ttagccccca cttgtttgcg ctagtaaggt cttgtattct acggagtaaa gcgagggtaa 2640
ttgaaatgat gaattacttg gagacattga tctactgacgg atggattcac gtcggaatat 2700
tctcatacac ttagaccgag atggaccgat atgaccgatg ctcttatcgt ttcttcgcgc 2760
gagactgttc tctccagtct cacgggtagt tagtacaata tagtacttat gtgaaaccgt 2820
tgacgacgcc cattcgctg gttttttttt tgacatgaat ggctgcttcg tatgttatag 2880
ttcatactcc ccacggagca cattgattaa catgcacatt gttgggatcg aggggtgttag 2940
gtaaaccatg ttgtgcgcc ggtcttcag ctggttggtt gtctttttat ttgcatttgc 3000
ccagcttcgc gcagacagcc aataaagagc gtatctcctg cccctcttg ctttcatcat 3060
atatgcagtg agatccgatt gataccaccg gagtgtgggc caaattagtt acactctcca 3120
ttggccgcaa aatattgaag ccttttgggg ttttttggc cccagga aaatgcaaaa 3180
ctaattgtga gtatgggggg gtgtgggtt tgttcaaac ctgccagtc aatatggagt 3240
ataggtaaat tacaaccaca atactagtga gatctagcag tggggccagt tcaatgcac 3300
ttgtgcgtcg taaataagcc cagacagct aataccgcaa cactccggt aacaaagaaa 3360
agcaaaatta aagacgtcg caatttcccc tgatccccat ccatcaatct gacttcaggc 3420
tagcggacct taacgaaaca acgagagcga gatcattcat acacaaaac acaggtaacta 3480
tagaagegcc gcgcagtaga gattcacacc gcccttgaa gcaaaagtcg gaaggaattg 3540
cgcgatgtca gaacctctac cccctaaaga aggggaacca aggccacaga aggaagaaa 3600
tcaaaatgac acgtcgaag cgactgagtc caagtcccag cacatcacag gcctcaagct 3660
cgggctggtg gttgcttcag ttactttcgt agcatttttg atgctcctg atatgtccat 3720
tctgtcacg gtaagatggt ggctacctca gaacagagcg cagcacagtc aattgactcc 3780
agccacagc aatcccacat atcacaagcg agttccactc tctgaacgat gtaggggtgt 3840
acggcagtc ttatctctg gctaagtatg gctctgttct ccttgacctt gttcattgta 3900

cgaacagatt agctaacatc atatttagct gtgctctcca gccctggcc ggtaaattgt 3960
atacactctt gggttgaag tacactttct ttgccttctt ctgtattttt gaactaggtt 4020
cgggtgctatg cgggtgccga agatcttcca ccatgttgat tgttggggcg gccgttgctg 4080
gaatgggagg ctgaggtctt gtcaacggag cctcacaat cctctcaaca gctgctccta 4140
agcacaagca accaggtgaag ggaaccgatt tttggaagtc tgctgggtgc cgtgtacacg 4200
ctgacctgc atatgaagtt ttgattggag tgatgatggg tcgtatgtca tctcaagatc 4260
tgatgtacc caaacgaacg gttcgtcgtc tgacaatatg ttttcagtta gtcagattgc 4320
cattgtctgt ggacctgc tcggaggtgc tttcactcaa cagccactt ggcatggtg 4380
tatgttgacc tttggcctt ttatgattgt tgtccatgtt ctacttgga attcaggctt 4440
ttatatcaat ctcccatcg gcgtgtcgc tgcatctctt cttctcgtca tcaccatacc 4500
cgaccgaatt tcatccacgg acagcgaact ctgaccgac aaaccaatgg ccaacataaa 4560
atccacactt cgcaactgg acctgtagg ctttgtggtc tttgcagct tcgcaaccat 4620
gatttccctc gcactagaat ggggagggtc gacctacacc tggcgaagtt ccgtcatcat 4680
cgccctgttc tgtggcggag ggtttgctct gattgcgttc gtgctatggg agcgtcatgt 4740
tgccgatgct gttgccatga ttctggctc agtggctggt aaacgacaag tgtggtgctc 4800
ttgtttattt atgggtttt tctctggctc cttgcttgct ttttctact atctaccgat 4860
ctacttcag gctgtgaagg atgtttctc cacactgagt ggtgtgtaca tgttgcttg 4920
aattcttgga caagtcatta tggctatggt ttctggcttc gcaagtaagt gaaactcgcg 4980
tacacatttt tctccacccc gtccatttct atggctcctt tcttgccaca accgtctgac 5040
atcgggcttg gatctgtgt atactgacat atgacgcacc agttggaaag acaggatact 5100
atttgcttg gcccttaggc agcgtgttc tcgtgccat aggcgcaggt ctggtatcca 5160
ccttcagcc ccatacatca actgtgaaat gggctcatgta ccaatttate gcgggcttcg 5220
gtcgtggttg tggcatgcaa acggtgaagt atgaaacctt tgatcatctc tcacgtttc 5280
ggctttgtat caaagcaaga agagcatgca accgttagac gctgacatca atactcaatg 5340
gccagctat catgccatc caaagcacgc tttcgccga acaaggtgcc ctggaattt 5400
ctctgcctg gtttgacag acgtttggag gatcgtctt cctggacttt gctaaccttg 5460
tctttgggtc cggtttgaga actggcctga gcaagtatgc gccactgtc gacacgcagg 5520
ccgtgacggc agcagggcg actggcttca gagatgtggt cagcaagaat aaccttcag 5580
gggttgtaaa agcttacagt ctgccgttg atcatactt ttacttagca gtgggagcta 5640

eggcgtgcac gtttgtgttt gcctttggaa tgggatggcg gaagattgca accaaaaacg 5700
acacccgggc tgtgcctgag actgatgctt gaccgcgttg ctagatagac acattaccgt 5760
gcctccacaa agaatctcca catacttaat taatgtcgat ttcaaagatt ctatatgtca 5820
ttgcccgcga cccatgtcta gtctaagtcc atctcaaggt tctagtcacc gtggctagat 5880
tggcaacata taactatgtt gagattcata gttagttagt tacggcatct gacaatggat 5940
gattgatgtt tcaggcatca atcctgatac ctgaggaatg aatcagatca acattcaacc 6000
tactcagtaa gttatagctt gaacaaagct ttcactcatt aaataattat gagggatcag 6060
acctaaacac tctctggaaa aggaccatct ctttatatat tcttcttccc tactacttgc 6120
atcgtaaatt tcaacaacat ataaacatga gatacccttt ctggccgttc actctaccac 6180
ctgcctgtct cattgcattg tgcttttgaa aattatgaca ataacaacca atgagaaaaa 6240
atatgatcct cctgcaatga atccactgga ggggggtacgg agcttggaat gctcctaaga 6300
ttccgaccta atcagcgtcg agcccgatca gtagctgcag cactcggcct cagtgcattg 6360
ttaggaacag ggactgtcct ggttccgcct gacggggaga cacttcgaga aggggctgaa 6420
gatgccgggg cagaacggtt gtgcgccatg tgcgccttga ccaggtgacc ggccgctagg 6480
gcagcacata gcgagagctc cccagccaaa acagcgcttc cgatgatgcg cgcaagttga 6540
cgtgcattct caccggggagt ggtcgggtgt gatccgcgga caccaagcat gtcaagcatt 6600
gcgccctggg gctccagaat cgtaccaccg cccaacgttc caacctcaat agacggcatg 6660
gagacagaga tttgaagcga tccgcgaaga ctaaacagga ttagtgaatg tttccaagta 6720
agcggccgct ttcaacttac ttgttcatga gtagtgatgca gttagcgctc tccacaactt 6780
gcgccggatc ctgacctgtg gcaatgaaaa tggctgccgc aagattggca gcttgggcgt 6840
tgaagccgcc aactgagcca gccatagcgg acccaatcag atttttcgat atgttgagct 6900
gaacctatgt atccacatcg ctctttaaga catccctgac aacgttcgcc ggtatgatgg 6960
cttcggccac aatgcccttg ccccgctccat cgatccaatt caaagctgaa ggtttcttat 7020
ccgtacagta atttctgat agggttaataa tattcatatc gctgaaacct gcctctgtcg 7080
ccataacatt cagtgcatgc tccacgcct tagaaatcat attcattccc atagcgtcgc 7140
cagtagtagt cttaaatega atatataagt gagtaccggc gatagttgtc cgcatacttt 7200
gtaagcgcgc aaatctgctg gttgaattga aggcttcttt cattacggtc tggccgacgt 7260
ccgaatcgag ccagatctta gcagcaccag ctcggttcaag gacatcaaac ttcacacacg 7320
ggcctcgtgt cataccgtcg ccagtcagga ctgtcacggc accgccaccg aggttgattg 7380

ccttactgcc acggctagca ctagcgacga ggacgccctc ggtggttgcc ataggaatga 7440
aataactctt gccgtcgata acaataggac cggcgacgcc aacagggaact ggcatatagc 7500
caataacgtt ctcgcaacat gcaccgagca cgcgttccca ggcgtagttt tcgtacggca 7560
gcttcgagtg ctccagcata cttgtaagct ctgcggtagc cgggtgtcctc gaaatgatag 7620
agcggcgaac cttgacggca cgagtgcagt ctttgagact cttctctagg gcatacccgg 7680
gaacctttcc ccgcaaagac aaggcaacga catctcctc gttcaactcg ctgattgtgt 7740
tctgttcag caaattgtcc agttcgattt gtgtgcgaga cacgggaagt tcactagtgg 7800
ctgtctttcc ttctgctcgc ttagtgacct ttagagatgc ttaattaag actaatgagg 7860
catcactgtc actgtcggtg gtggtaggag tgaacactct ggtctgagga gcttgagac 7920
ttgattgaat ctgaggggtc tggttctggg cagcgttgaa gctttcggcc tggtaagct 7980
caactggatc aactgggtga ctcgggagat taggatcttt gattcccagt ctggcggcct 8040
tgaacagata gctgttcaga gcgacactta gggcaagtgc cacaacacc catttgagga 8100
ggacgggatc ttccaggctg gtgagcaggc taccgaccat tttccacca actccatact 8160
cgtgtagctg cgaggtacca cggatgaatgg aaggatactc tagttcgtac ttgatggggg 8220
cgaggacagt gaccatagtc gattgaccgc gccctcttgc ctggaaaagt agttcatcta 8280
gtccacttcc agctaccttg aagggtcaa gcgggggttt aatggccgat ccgctcagac 8340
tttcgggtcca agatgatata ctggacaacg atccactaga agaggcttgg aaaagggtgg 8400
agccgatgtt gacgaggttg acgataagga aaccaacgac catccagaat ttgaacttcg 8460
gaacactgct gcctttcata tcattgcaa acagatatgt acgtgcaactg tcttgggcat 8520
cattgtgtgt cgcgacactc tccgcgctcc gctgactgag accctcatct tccaacgct 8580
accgatgtt gatatgacgt ttgaggcggg ttacctcgag cttgatagac agaatcgag 8640
tgtagaatgt aaacagcagc agacagtcaa agaacaggat caatgcagct agaacacaga 8700
agtgtgtag ccaccttgg atgcctaaga cagcacgat aactaggagc aggatctcga 8760
ccacgtagtg gcacacgata ttgtaacct tctccgaat ggcgcttcgt acggcgtaat 8820
tgatggtact ttcagcaatg gctgtcacgc taccctggtc agactgtatc ttctggggct 8880
ttcgggtgct cacagcatag gacaaaacag ccctggtcag agtgatgctc ttctcaaagc 8940
caacgatcac caccaagaag gggaggcctt cggatagcaa cctcatgctc atcggaacct 9000
ctagtcttat ggccacgtcg agaccgagga gaaaggcaaa tgttgacgac aaaaggacgc 9060
ttgtagccag ccaaaccttc gatcccaatt tttctatgct gaggaagagt gagacgaaag 9120

tcaagtgcatt tgatatataa cctagcacca tgacaaccac gtcgagcgtt tgagcgcctt 9180
tgataagatc aagagactct gtccaggtat cgtgcaccca ttgagcaagg ctgcgttttg 9240
tgtgagccct ggcagccttc atgatccaca tctggcgctc catctcgatc aattgcgtct 9300
cctgcaattt caggteggca ctgttggttg ggattttctg aacagcagcc acgagttccg 9360
gcgcgctgct gtattccaca gagaaggcga aaactttatc ttctgaatag gcggttaaag 9420
ggctcgacgt tgagggaagg tcaatcacag ataggttcac agggagggga gcaaggaatg 9480
gtgaggctgc ttgagatgca accccatatg accccgggaa taccaaggtc attagtgtt 9540
gatggttgaa atctccgaga acatctgcat ccccgtcgaa gctctgccac ttccagccat 9600
tctgtgggccc ggtgatcaag ctctgacttc ctctgaccaa agagcccat tctgctttat 9660
caacgtttgc ggggccatgg aagaagctgt ctttgagtag tccaacgtat gtggtactag 9720
ctagaatagc tatggtgcaa acggtatgga tcgggtgtag acacgccgtt ttgtagataa 9780
attggagtgt ggaggtcaat gcccgatttc ccgagcgtag aggggtgctc tgattcattg 9840
attccctacc gcgaaagcga gagggtagca acgaagcgac catgtgaaa ggtctgtgct 9900
acagcttgga gtggtacctt tagctaggta gtctctgaga aaagaatcta gtcagctctg 9960
caaatgggga cggaaaagca cttcaattgg gaattagggc ttgagataaa gtgcatacct 10020
ccaaaatcga atgagcaacc taatcggtta ggcgcctagg tataatctgc cgtcgtatag 10080
tggaggaagg ttgttcggcc caaggggttg ggagggacaa ctgaacagtt cctaggtacg 10140
ggaaatgagt agaagaaaat aacaaatggc gcgcgcctt gaggtgagg cagcggaaag 10200
attcgcttcc ttatccctgc atctggtcca cttttatgaa tggattcatg accggtgtca 10260
actgctgcct aggggtataat tggtaagggg taccaagcaa aggatagtag gaccaattgc 10320
actgaaaact agtatttttg ctcataacta tgctcagttt ccaaggtttt tatgcataaa 10380
tttatecttt attcgagaaa aaagaattct ggggacacca atcaattgcc ctgataccta 10440
ggaatgtgaa cttccaagat tgttcgaaa gtaggcacaa tgaccaataa gacagaacac 10500
tacctaggta tagttatttt gtcatgcta gatccgacat acaaaggagc gtcctcttac 10560
atagacgtcc tggtagacgt ttctaactct actcgtattg tggctctttt ttggtggggc 10620
ggcaagctgc atcgatcacg cccggacgag gccacttcgt gaggaatgga aatatattgt 10680
gcctacggag taatgcacca cgaaacacat tcttctcgaa acgactactt acgcagggat 10740
gtatgggtat tattctgtcc acgaaaagcc agtgtcaacc ccccccccc ccccccccc 10800
cggatcatt tatctcagta aacagcaacc tgaacaagat acccaggtag acaagaagtc 10860

agtttggagt atagtgtata gactcgggaa cattttgtgt ggacctcgt acgtgtctct 10920
caaatcggcg tctctcggtc tttggatacc ttcggagtta cacggggctt tgttgccaag 10980
gcttcaatat tcggcgcattg gattttcttt gtgcattgggt ctgagtgggg tgccgtaagg 11040
tatggtattg ctcccattg ggagttctga cagatgatca tgccgccttc cgaagtagaa 11100
aaaagaggaa agggtcacat gctcatgatg atcgtttgc cgcgatgaat tgcgcttctt 11160
gcataatatt tgtttgcttg tcttagtcaa ccgataatgc aaattttggg gatttgttat 11220
tgttggaaat tgaattacca actgcttaca ggaccacccc tgcgctcagg cctcaacaa 11280
accttgggac aggattaccc actaagcctt tccaagcttt tccaaggctt ttggattcgt 11340
ttggtttgat agctcgtatg cgtatttcgc atctgtgtac ggagtatcgg attctgacag 11400
cctccattat acccgaaaac tacctggcgc gctgacctg tttcgtcttg ttcgacgggt 11460
tcccatcggc gttttgactc gggattatcg tgacgacaga caatgcctcc cgaaccggta 11520
cctctaaggt attgccccga gcatagcatg gtggtccggg gtttcccatg ggcacagagc 11580
gaatatcgtg tcacgtccaa gatgaaaaca aaccccgaa tatgaatcac gtgtcggggg 11640
cagcttatgc atctatagct atgccaggga cctgtagact gttggaagac tatcaacgg 11700
tttatcacca gggcgactga tatatcagtc aatgaaacaa cgttggaatg aacaataccc 11760
ccgccgtaac cgcaaccgca accgcaaccg caaccgcaac cgcaatggca ggctcggctt 11820
gctctaacac atccagccc attgccatag ttggaatggg atgtcgattt gctggagatg 11880
caacgagtc acagaagctt tgggaaatgg ttgaaagagg aggcagtgc tgggtctaagg 11940
tcccctctc gcgattcaat gtgagaggag tataccaccc gaatggcgaa agggtcgggt 12000
ccgtgagtat ctaacatgca tgcatttata tcttgtttg aatatttgac acaagatttg 12060
agcatcactg aagcttggtt actgactcca aggatgactg gatagaccca cgtaaagggt 12120
ggacacttca tcgacgagga tctgcttta ttgacgccg cgttcttcaa catgaccaca 12180
gaggtcgcca gcgtatgatt atttcaattg atctaaccg ggacgcagag atctaattt 12240
ggacagtga tggatccgca gtatcggtt atgcttgagg tggcttacga atcgctggag 12300
agtggtatgt agtgtgggtc atcctcactg taagcaaag tcaactgacca tcatccagcc 12360
ggtatcacca tcgatggtat ggcaggctct aatacgtcgg tgtttggggg tgtcatgtac 12420
cacgactatc aggattcgt caatcgtgac cccgagacag ttccgcgtta tttcataact 12480
ggcaactcag gaacaatgt ttcgaaccg atatcacact tctacgactt acgtgggtccc 12540
agcgtgacgg ttgacacggc ctgttcgacg acattgaccg cactgcactt ggcgtgccag 12600

agcttacgta ctggggagtc agatacagcc atcgttatcg gtgcaaatct tctgctcaat 12660
cccgatgttt ttgttacgat gtcaaacctg gggtaggttt tccgaagaag attccagatc 12720
gagagtcttg aactaagcaa tcttgttgcc tcaatgacag atttttgtcc ccggatggta 12780
tctcgtaactc ttttgatcct cgagcgaatg gatatggctg cggggaagga attgccgctc 12840
tggtataaaa ggccctccct aacgcgttgc gagaccaaga ccctatccga gccgtcattc 12900
gagagacagc gctgaaccag gatggcaaaa caccgcgaat tactgcgccg agtgatgtgg 12960
cgcagaaaag tctgatccag gagtgttacg ataaggctgg gctagatatg tcgttgacct 13020
cgtacgtgga ggcccacgga actggaacac caactggtga ccccttgaa atctcagcaa 13080
tttcagcagc ttttaaagga catcctctgc accttggtc tgtgaaagca aatattggcc 13140
atacagaagc cgccagtggc ctggccagta taatcaaggt ggccttgcc ttggagaagg 13200
gcttgattcc ccctaattgc cggttctgc aaaagaacag caagctgatg cttgaccaa 13260
agaacatcaa ggtaaggctt tgcgcattcg cagattcagt tatatgttc aaaggttaat 13320
gtttcaaaga tccccatgct tgctcaagac tggcctgtga aagatgggac tcgtcgcga 13380
tctgtcaata acttcggctt tgggtggtcg aatgctcag tcattttgga atcatatgat 13440
cgcgcacatc tggccctgcc agaggatcaa gtgcattgca atggtaactc tgagcatggt 13500
agggttgagg atggttccaa acagagccgc atatacgttg tgcgtgcaa ggacgagcaa 13560
gcttgctggc gaacgatagc aagcctgcga gactacatta aatccgtcgc tgacattgac 13620
ggggaaccct tctcgccag cctcgccat acactaggct ctgcgcgtc cattctgcca 13680
tgagcgtcag tgtatgtagc agacagcctt ggcgcccttg tttctgccct cagcgatgag 13740
tccaatcaac caaaacgagc gaatgagaaa gtacggctcg gatttgtatt caccggtcag 13800
ggggcgcagt ggcattgcaat gggcagagag ctggtcaata cattccagc attcaaacag 13860
gcgattcttg aatgtgatgg ctacatcaag caactgggcg cgagttggaa ttttatgggt 13920
aagttgcgag cccgggaaaa gtaatactgt atcaagcttg aggtactaac attcaattgc 13980
acagaggagc tccaccgtga tgagctgacg actcgggtaa atgatgccga atacagtcta 14040
ccactgtcaa ccgctatcca aattgcactt gtgcgtctcc tttggtcatg gggaattcgg 14100
ccaacgggga taaccagtca ctcaagtgga gaggtgctg ctgcctacgc agctggggct 14160
ttatccgcgc ggtcggccat tgggatcact tatatacgcg gtgtattgac cactaagccc 14220
aagcccgcat tggcagccaa aggaggaatg atggcggtgg gtcttggtcg cagtgagacc 14280
aatgtttaca ttctcgtct caaccaggag gacggctgtg tgggtggttg atgtatcaac 14340

agtcaatgta gtgtgacggt gtcgggagat ttgggtgcaa tcgagaaact tgaaaagttg 14400
ttacacgccg atggcatctt taccaggaaa ctgaaagtca ctgaagcctt ccattcaagc 14460
cacatgcgac caatggcaga tgcctttggg gcgtcactga gagatctgtt caactcggt 14520
aacaacaacg acaatcccaa tgctgacacc tcaaagggtg tattatatc atcacctaag 14580
actggtagtc gcatgaccga tcttaaattg ctattggatc ccacacactg gatggatagt 14640
atgctacagc cggtagagtt cgagtcctca ctccgcgaga tgtgctttga tcccaacacc 14700
aaagagaaag ccgtcgatgt gattattgaa atagggcctc acggagcgtt tgggtgtcca 14760
atcaaccaag tcatgcagga tctgggtctg aaaggaacag atataaacta tctcagttgc 14820
ctttctcgcg gcagaagctc gttggagaca atgtatctg ctgctacgga gttgataagc 14880
aagggttatg ggctcaaaat ggacgtata aactttctc atggaagaaa agagcccaga 14940
gtgaaggtae tgagcgattt gccggcgtae ccgtggaatc accaaaccgc ttattggaga 15000
gagcctcgcg gcagtcgtga gtccaaacag agaaccatc cgcctcacac tttgataggc 15060
tcacgggaat ctctctctcc tcatttcgcg cctaaatgga aacatgttct ccgtctgtca 15120
gatattccat ggatacgaga tcacgtcgtt ggttcgagca tcctctttcc gggagctggc 15180
ttcatcagca tggccatcga ggggttttca caagtctgcc caccagttgc gggggctagc 15240
atcaactaca acttgctga cgttgaaact gcgcaggctc tcataatacc cgtgatgca 15300
gaagcagagg ttgacctgc ctaacgatc cgttcattgt aggaaaggct cctcggcaca 15360
aagaactggc atcaattttc tgtgcactca atttcgggcg aaaataatac ctggacagaa 15420
cactgcaccg gattaatacg ttcggagagc gaaagaagcc accttgactg ttcaactgtg 15480
gaagcctcac gcaggttgaa tctaggctca gataaccgga gcattgatcc caacgatctc 15540
tgaggagtcct tacacgcgaa tgggatatgc cacggacca tttttcagaa cattcagcga 15600
attcaaaaca atggacaggg ctggttttgc agattttcca ttgctgacac tgcctcggt 15660
atgcctcact cgtacgagaa tcgacacatc gtccatccta ctactctgga ctcggtgatc 15720
caggcggcat acacggtgtt accctacgcg ggaacacgta tgaaaacggc catggtacca 15780
aggaggctaa gaaatgtcaa aatatcctct agcctggctg acttgaggc tggatgct 15840
ctggacgcac aggccagcat caaggatgc aactctcaat ccttctctac cgaacttgga 15900
gtgtttgatg actatgatag cggttcttct cctcggacg gaatcccagt catagagatt 15960
gaaggccttg tttccagtc ggttggaagc agcttctctg accaaaagtc agactccaac 16020
gacacagaaa atgcctgcag ctctgggtt tgggccctg acatcagctt gggtgactcc 16080

acttggtca aagaaaagtt gagcactgag gctgagacga aagaaacgga actcatgatg 16140
gacctccgaa gatgcacgat caactttata caggaggctg tcaactgattt gacaaattct 16200
gatatccaac atctggatgg ccaccttcag aagtatttcg attggatgaa tgtccaattg 16260
gaccttgca gacaaaacaa gctcagccca gccagttgcg actggctaag tgacgatgct 16320
gagcagaaga aatgcctaca ggccagagtc gctggagaaa gcgtaaatgg cgagatgatt 16380
tctcgtctag gacctcagtt aatagcaatg ctacgccgag aaacagagcc acttgagttg 16440
atgatgcaag atcagctgct aagcagatac tacgtcaacg caatcaaattg gagccgatca 16500
aacgcacaag ccagcgagct gatccgactt tgcgccaca agaaccgcg ttctcgcatt 16560
ttggagattg ggggaggcac gggcggtgc acaaagctta ttgtcaatgc attgggaaac 16620
accaagccga tcgatcgtta tgacttcacc gatgtgtctg ccgggtttt cgagtcggcg 16680
cgtgagcaat ttgcggattg gcaagacgtg atgactttca aaaaattgga tattgaaagc 16740
gatcccgagc aacaagggtt tgaatgtgcc acctacgatg tggctgtggc ttgccaggtc 16800
ctgcatgcaa ctgatgcat gaaacgaaca ctgagtaacg ttcgaaaatt gctcaagcct 16860
gggggcaact tgattttggt tgagactacc agggatcagc tcgatttggt ctttaccttc 16920
ggactgttgc caggttggtg gctcagttag gagcctgagc ggaagtcgac gccatcgctc 16980
actaccgatc tttggaacac catgttggac acgagcgggt tcaacgggtg ggaattggag 17040
gttcgtgatt gtgaagacga tgagttttac atgatcagca caatgctatc gacggctaga 17100
aaagagaata caaccccgga tacagtggca gaatcggagg tgcttttgct gcacggagcg 17160
ctccgacctc cttcatcttg gctggaaagt ctccaggcag caatttgta aaagaccagt 17220
tctagcccat cgatcaacgc tctgggcgag gtagatacca ctggaaggac atgcattttt 17280
cttggggaaa tggagtcctc gctccttga gaggtggga gcgagacctt caaatccatc 17340
accgcatgc tgaataactg caacgcactt ctctgggtgt ctagaggagc agccatgagc 17400
tccgaggatc catgaaagc tctacatatt ggtctgctgc gtaccatccg caacgaaat 17460
aacgggaagg aatatgtatc gttggatctc gatccttctc gaaacgcata caccacgag 17520
tccctgtatg ctatctgcaa tatcttcaat ggccgctcg gcgaccttc cgaagacaag 17580
gagtttgaat ttgcagagag aaacggcgtc atccacgtac cgcgactttt caatgacctg 17640
cactggaagg accaagaagc ggttgaggtc aactgcagc cgttcgagca acccgggcgt 17700
cgtctgcgga tggaggttga gacgccaggg ctcttagact cctgcaatt tcgagacgac 17760
gaaggacgtg aaggcaagga tcttcggat gattgggtag aaatcgaacc caaagctttc 17820

ggcttcaatt ttccggatgt catggttgcc atgggtcaat tggaggccaa ccgtgtgatg 17880
ggcttcgaat gcgccggagt gatcacaag ctccgtggag ctgctgccgc tagccaaggc 17940
ctcagattag gggaccgcgt atgtgcaact ctgaaaggcc attgggcgac cagaacacag 18000
acgccgtaca ctaatgtcgt ccgtattccg gacgaaatgg gcttcccaga agccgcttcg 18060
gtccccctgg ctttcaactac cgcataatatt gcgctttata ccacggcaaa gctacgacga 18120
ggcgaaagag tcttgatcca cagtggagct ggaggcgctg gtcaagcagc gatcattttg 18180
tcccagcttg cgggtgccga ggtcttcgtc acagcgggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18240
gtcggcgata aattcggcat caatccggat catatcttct cgagcaggaa tgacttattc 18300
gtcgacggca tcaaagccta cacggggcgga cttggcgctt atgtcgttct aaactcattg 18360
gcaggtcaac tcttccaagc aagctttgac tgcattggcc aattcggcag atttgttgag 18420
attggaaaaa aggacctgga gcaaacacgc agacttgaca tgctgccatt caccggggac 18480
gtctctttca catcaattga tcttctctcg tggcaaagag ccaaaagtga agaagtatcc 18540
gaagcgttga accatgtcac aaaactctc gagacaaaag cgattggctt gattgggtcca 18600
atccagcagc actccttgtc aaacatcgag aaggccttcc gtacgatgca gagtgggtcag 18660
catgttgga aagttgttgt caatgtatct ggggacgaac tgggtcccagt cggcgatgga 18720
gggttctcgc tgaagctgaa gcctgacagt tcttacctag ttgctgggtg gctgggggga 18780
attggaaagc agatctgtca gtggttgggt gatcatggcg cgaagcactt gattatccta 18840
tcgagaagtg caaaggccag tccattcata accagcttgc aaaatcaaca gtgcgctgtc 18900
tatctacacg catgtgacat ctcagatcaa gatcagggtca ccaagggtgct ccggttgtgc 18960
gaagaagcac atgcaccgcc aattcgaggt atcatacaag gtgccatggt tctcaaggac 19020
gcgcttctat cgcgaatgac attggatgaa tttaatgcag caacacgccc aaaagtacag 19080
ggtagttggt atcttcacaa gatcgacacg gatgttgact tcttcgtgat gctctcatcc 19140
cttggtgggg tcatgggtgg ggcaggccag gccattacg cagctgctgg tgcattccag 19200
gacgcacttg cgcaccaccg gagagcccat ggcatgccg ctgtcaccat tgacttgggc 19260
atggtcaagt ctgttgata cgtggctgaa actggccgtg gtgtggccga ccggctcgt 19320
agaataggtt acaagcctat gcatgaaaag gacgtcatgg atgtgttgga gaaggcaatc 19380
ctgtgttctt cccctcaatt tccatcacct cccgcagctg tggttacagg aatcaacaca 19440
tccccgggtg ctcaactggac cgaggcaaac tggatacagg aacagcggtt tgtgggactt 19500
aaataccgcc aagtccttca tgcagaccaa tctttgtct cttgcataa aaaaggacca 19560

gatggcgtgc gggcccaact aagcagggtc acctctcag acgaggccat ttctatcgtc 19620
ctcaaagcaa tgacggaaaa gctgatgcga atgtttggtc tggcagaaga cgacatgtcc 19680
tcgtccaaaa acctggcagg tgctggcgta gactcactcg tcgccattga acttcgaaac 19740
tggatcacat ctgaaatcca tgttgatgtg tcgatctttg agtcatgaa tggtaacacc 19800
atcgccggcc tcgtcgagtt agttgtggcg aaatgcagtt aagttgaagg gttcagtga 19860
gccttttgtc tggccaagcg ggtatagctc gacggaggta tagtacgaag gagcatagcg 19920
gccatggtct gaagcctgaa tccaatctga atcgagcctg ggctgagcct gactatttaa 19980
tgctgactt ctggatagca gtaaatagag atacctgaaa taccattaca gtggccctga 20040
gaagcaacaa agtacacatg tgcactcgtt ctgaagtcg gaagagtga tgctttttat 20100
actaccaggg aagctgtctt agcacctcgg aggcttgact gtcaaaagtt ctctcttttt 20160
ctctccatta tgattcccgc aagccttgta aatgcgcgtt gaacggtcga aaggcgttgg 20220
cacgggcagt gggtagat tgtggatatg tagtcggaag gcgggaggga gtacttgtgt 20280
ccacgtcgtt gcgcgcct ctctttcgcc tagtcgggga tgttgagtag gaacatcaag 20340
acttaacaga gcctaagccc tcgtcatcgt aagcgccagt caacgcctga gagaatgggg 20400
agatcggtag ttgtaccggg agaaaagctt cattactgcc gacttcccta cgtggcggtg 20460
tagctggcgg tatagaagca gatggccgct ctgcgtagca ggaatacaca ctctctccct 20520
tctctctctc tgtgtttctg tctctcgcac atagccaaag tctacaccac gttcgattac 20580
aaagaaggca tcacaatcga ataaaatgcg ttttatttta ctaacctact cgactaatac 20640
agcacctagt ttctctggga cggaaactat tggaataagc ctggggacgg atgcataatt 20700
gttttagttt gcgtgttata tcttagcacc ggcatgagg gagcgggatg tcctcgttgc 20760
gccggcgtag catgagcttt gtggttgat gcatacgaac gctaaaagcg tgacggtagt 20820
atttgcac gtctcctggt acaggcttca catcactg aatcagtata tgagcgagga 20880
gaatcttgat ttccttcgag gcgaagaacc gccgggaca agcgcgtggg ttccagccga 20940
agccgatgtg atcacggtg gtattctcca attgagcggg gaaggccttg tctggatcct 21000
cgcgcatgcg cataaatcgg tagggatcat aattttcggg gtttccac acatcagggt 21060
tgttcatgcg gtctgcagcc acagcggcca actcgccctt gggaatgaag aggccattgg 21120
atagagtgat gtctctgaga gcggtactgc gcatagtggc gcactcgacc ggcttgattc 21180
gtgcgtctc tttcatgcag ctgtcgagga gcttcagctt gaacagagag gcaggcgtcc 21240
agcccccttc tccgattaca gtgcggatct cttggcggag aggctgaata aggtctgggt 21300

gcctggcaat gtccacaagg gcaccgacga aaagatccgt cgaggcgtag atgccggcga 21360
aatccatagc gagctgagca cccgccacat cgtaccagcg gccgtcggcg gtgtcttcaa 21420
accattgcat ggtatcgacg tactggggcg gctgcacgcc ctctcgctaca catgcggcct 21480
tttcagcagc tcgtcgctga atctcaggat caatgatctt tcgtgcgcgg cgcaacttgg 21540
cacgcaattt gcgtccttgc ggttgaaacc agtgagcgag cggtcgcagt agcatgggcc 21600
atacgcgaag ttggcgagct tgtaccgcca cactcacggc atggttcttt gcaatatcca 21660
gccactctc attgtggcag attttgtcgc cgaccataat gagtgtgact gttcgtgtga 21720
caaggtccaa tccattggaa tagacaggtg cggtttgcca ctctagtata ttccggtat 21780
gtcagccaga ggctcaatgc tcaagacaga aaaattgaca cttaccctcg cttttaccga 21840
acaacttggc aatagtagcg tcggccaagg tagccaatgg ctttgtgtac ttgggggctt 21900
gggtttgtaa ctggttcaaa acaactttgt tgacaagatg tgcactctgg cagatttct 21960
tgaaccgctc gaatccaggg agatgagagt gaaagtccta tacattcacc agaattctag 22020
agacgtcatt gagttacaac aatggaaaat tcagaggtca tacatccgcc aaaaacttgt 22080
acatgcacat atctttgatt ttccgaaact cgtcggccat ggacgatggg aggatgggtgc 22140
aatagccgga atcaacaatg aagcgcaggg gcttgctgtt ttccgagAAC caagcttcga 22200
tccagctcgg accatacgta tcgaagtcct gctagccct catggtcgtc aactcccacc 22260
atTTTTTggg attatagact tgcagttcgg actggcgccc ccgcaaacgg taggcgatga 22320
gactaagaag cactgcgacc gccacaaggg cttgaggggt cgatacccat tggtacgatt 22380
cgacggtcag aagaacctgg ccgagcattg cgtgagacag ataggaccta tgcacaccag 22440
tggaagaa gaaagagcga agaattgagag cgctgcgacg gtttataatc gaataacagc 22500
actaatgctt ctgggatttt gtggccgaga gcactcttcc agtcaacctt gaaaaaaaaa 22560
aaaccccccc cccaatcgaa gtttacctgg atggggcagt tcggttgtt ctttaggag 22620
cagcttcacc gagcagcaca agaacaatcc gagtgaAAAA ctcggtttca cttgataca 22680
gccaatgat attcacgttt gattcattca gcctcgtgtg accgaataac gccgtatgga 22740
ggaatggcta ttctgtcacc gaatgacgcc gggagggttt gctaggtgcc gagcttgcat 22800
tgctgggaag tgggggcatt tgagtactag aatggatctt gaaattgtcc gaattagat 22860
gagtactgat acgtgcaagt aatatataac acggtatcgg ttgcaaggcc ggcttgttcg 22920
ctcagagatt caactctgcg attctgtaag acaaatgtt gtgcccggca tgcagtgaga 22980
agatctactg acgcaagaca aggtttaatc ccaatctat cgcccaaaaa caggatcagc 23040

agttatggat caagccaact atccaaacga gccaatgtg gtagtgggaa gcggttgctg 23100
gtttccaggt ggtgtcaaca caccatcaaa actttgggag ctgctcaaag agccccggga 23160
tgtacagacc aagatcccta aggagagatt tgacgtcgat acattttaca gccccgatgg 23220
cactcacccc gggcgcacga acgcaccctt tgcatacttg ctgcaggagg atctacgcgg 23280
ttttgatgcc tctttcttca acatccaagc tggagaggcc gaaacgattg acccacagca 23340
aaggtgctg ctggagacgg tctatgaagc tgtatccaac gcaggcctac ggatccaagg 23400
ccttcaagga tectctactg ctgtgtacgt cggtatgatg acgcatgact atgagactat 23460
cgtgacgcgt gaattggata gtattcctac atactctgcc acgggggtag ctgtcagtgt 23520
ggcctccaac cgtgtatcat acttcttcca ctggcatggg ccgagtgtga gtgccactca 23580
ttgagcgagc ccgacttcgt caagtgtga cagattcctg actgattctg cagatgacga 23640
tcgacacagc ctgtagttca tccttagctg ccgtgcattt ggccgtccaa cagcttagaa 23700
cgggcgagag taccatggcg gttgcagccg gtgcgaattt gatattgggc cccatgacct 23760
ttgtaatgga gagcaaattg aacatgctgt cccccaatgg tagatctcga atgtgggatg 23820
ctgtgccga tggatatgcc agaggagtaa gttgacaatg catcaattcc ttcaaaaaa 23880
agcaagatgg cactgacctc ctgtaactgc ttttaggaa ggtgtttgct ctattgtcct 23940
gaaaacgctg agccaggcac tgcgcgacgg ggacagtatc gagtgtgtta tccgagagac 24000
cggatatcaac caagatggcc gaacgacagg tatcacaatg ccaaaccata ggcacaaga 24060
agccctcatt cgggccacat atgccaaggc tggctttgat attaccaacc cccaggaacg 24120
ctgccagttc tttgaagccc atggtaagtg gtattcctg gaagtatcag ccttatggaa 24180
gttgcagaaa gtctctctct ccctaacacg aagatccag gaactggtac accagccggt 24240
gacccacagg aagctgaggc tattgcaaca gccttcttcg gacacaagga tggaacaatc 24300
gacagcgacg gcgagaaaga tgagcttttt gtcggcagca tcaagacagt tctcggtcac 24360
acggaaggca ctgctggat tgcgggctta atgaaggcat cgtttgctgt acgaaatggc 24420
gtgateccgc caaacctgct gtttgagaag atcagtcctc gtgtcgctcc gttctatacg 24480
cacttgaaaa ttgcaacgga ggccacagaa tggccgattg ttgcgccgg gcagcctcgc 24540
agagtcagcg ttaattcatt tggtaaggat tcaactgcac ttcttgagaa cgaaagtga 24600
gttagctaaa catataaaca catcaggatt tgggtgtaca aatgcccatg ctattatcga 24660
agagtatatg gctcctccac acaagccgac agcagtggta acagaggtga cctcagatgc 24720
agatgcatgc agcttgcccc ttgtgctttc atcgaagtcg cagcgtcca tgaaggcaac 24780

gctagaaaat atgctccaat ttctggaaac gcatgatgac gtggacatgc atgatatcgc 24840
atatacctta cttgagaaac ggtctatctt gcccttccgt cgtgcgattg cagcacacaa 24900
caaggaagta gcccgcgagg cactggaggg tgccatcgcg gacgggtgagg tcgtcaccga 24960
cttccgcacc gacgcgaatg acaaccctcg cgtactaggt gtctttactg gccaaaggtgc 25020
acagtggccg ggcatgctga agaagctcat ggtgggtatg ccatttgtga gaggcattct 25080
cgaagagctg gataattcac tgcaaacact gcctgaaaag tatcggccta cgtggacact 25140
gtatgaccag ctcatgcttg aaggggatgc ctcaaagtc agactcgcca gttctccca 25200
gcctctatgc tgcgcgtac aaatcgttct ggccgactt ctgctgcag ctggtatga 25260
gttcagtga attgtcgcc acagttcagg tgagattgcc tgtgccttg cggcaggatt 25320
catcagtgc actcaagcta tccgtattgc gcctctcgt ggagtttgt cgcggagca 25380
tgctcttct ccaagcgcc agacaggcgc tatgctagcg gcaggtatgt cgtacgatga 25440
cgcaaaggaa ctatgcgagc tcgaagcctt tgagggtcgg gtctgcgtcg ccgctagcaa 25500
ttcaccggat agtgtgacct tctccggcga catggatgct atccagcac ttgaaggtgt 25560
cttggaggat gaatccactt ttgccagaat cttgagagtt gacaaggcct accattcgca 25620
tcacatgcac ccattgcgag ctccatatgt caaggcattg ctggagtgc actgtgctgt 25680
tgccgatggc caaggtaacg atagtgttg ttggttctt gccgtccag agaccagcaa 25740
gcaaatgact gtacaggatg tgatgccgc ttattggaaa gacaatctcg tctctccggt 25800
cttgttctcg caggctgtgc agaaagcag catcactcat cgtctaactg acgtcgccat 25860
cgaaattggc gccaccctg ctctcaaggg tccgtgtcta gccaccatca aggatgtct 25920
tgccggtgtg gagctgccgt ataccgggtg cttggcacga aacgttgacg atgtggacgc 25980
ttttgctgga ggtctgggat acatttggga gcgtttcgga gttcggagta tcgacgccga 26040
gggcttcgta caacaagtcc ggcccgatcg tgccgttcaa aacctgtcaa agtcattgcc 26100
cacatactct tgggatcata ctgctcaata ctgggcagaa tctcgtcca cccgccagca 26160
tcttcgtgga ggtgcgccc atcttctgct tggaaagctt tcttcttaca gcacagcatc 26220
gacctccag tggacaaact tcattcaggcc ccgggatctg gaatggctcg acggtcatgc 26280
gtacaaggc cagactgtgt tccccgtgc tgggtacata attatggcca tggaagctgc 26340
catgaaggtg gctggtgagc gtccgcca agttcagctc ctggaaatct tggacatgag 26400
catcaacaaa gccatcgtgt ttgaagatga aaacacctcc gtggagctga acttgacagc 26460
cgaagtcacc agtgacaatg atgaggatgg ccaagtcacg gtcaaatttg ttattgatc 26520

ctgtctggca aaggagagt agctttcgac atccgcaaa ggccaaatcg tcataaccct 26580
tggcgaggca tcaccgtcat cgcagctttt gccgccacct gaggaagagt acccccagat 26640
gaacaatgtc aacatcgatt tcttctatcg ggaacttgac ctcttgggt atgactacag 26700
caaagacttc cgtcgtttgc agaccatgag aaggggcgac tccaaagcta gcggcacctt 26760
ggctttcctt ccaettaagg atgaattgcg caatgagccc ctcttgctcc acccagcgcc 26820
cctggacatc gcgttcaga ctgtcattgg agcgtattcc tctccaggag atcgtcgct 26880
acgtcattg tacgtgcta ctacgttga cagagtgact ctgattccat cgtctgtat 26940
atcggcgggt aattctggtg aaaccgagct tgcgtttgac acaatcaaca cacacgacaa 27000
gggtgatttc ctgagcggcg acatcacggt gtacgattcg accaagacaa cgcttttcca 27060
agttgataac attgtcttta agcctttctc tccccgact gcttcgaccg accaccgaat 27120
cttcgcaaag tgggtctggg gaccctcac gcccgaaaaa ctgctggagg accctgcgac 27180
gttgatcata gctcgggaca aggaggacat tctgaccatc gagcgaatcg tttacttcta 27240
catcaaatec ttcctagccc agataacccc cgacgaccgt caaaatgccg acctccattc 27300
ccagaagtac attgaatggt gtgaccaggt tcaggccgat gctcgggctg gccaccatca 27360
gtgttaccag gagtcttggg aggaggacac ttctgttcac attgagcaaa tgtgtgaaag 27420
gtacacccaa agctgttcg tgttttttca ttcttttata ttaacctttt acttgaagca 27480
actcgtccca cccacatgtg cgctgatcc aaagggtagg caaagaatta atttcaattg 27540
ttcgcgggaa cggggatcct ttggatatca tgaaccgca tgggttggtc accgagtact 27600
ataccaacaa gctcgcttt ggctcagcaa tacacgtcgt tcaggatctg gttagccaaa 27660
ttgtcatcg ctaccaatec attgatatcc ttgagatcg taagtcgaat ctgaaatgta 27720
agtaactagg cagtttgcta atctgtcgtt cgcttttttag gcttgggtac aggcacgccc 27780
acgaagcgcg ttcttgcatc acctcaactt ggtttcaaca gttacacttg cactgacatc 27840
tcggcgatg ttattggcaa ggcccgtgaa caactttcgc aattcgacgg tctcatgcag 27900
tttgaggcac tagacatcaa cagaagccca gcagagcaag gattcaagcc tcaactctac 27960
gatctgatta ttgcatccga tgctctccat gccagctcca acttcgagga aaaattggct 28020
cacataaggt cttgtctaa gccgggtggt cacttggtta ctttcggggt caccatcgc 28080
gagcctgctc gcctcgctt catctctggg cttttcgtg atcgatggac tggagaagac 28140
gaaactcgtg ctttgagtgc ctgggggtcc gttgaccaat gggagcatac cctcaagaga 28200
gttgggttct ctggcgtcga tagtcggaca cttgatcgag aggatgattt gatcccgctc 28260

gtcttcagta cacatgctgt ggatgccacc gttgagcgtt tgtatgatcc actttctgct 28320
ccattgaagg actcatatccc gccattagt gttatcgggtg gcgaatcgac aaaaaccgaa 28380
cgcattttga acgacatgaa agctgcccta ccgcatagac acatccactc cgtcaagcgg 28440
ctggaaagtgt ttctcgacga cccggccttg cagcctaagt cgacttttgt cactctctcg 28500
gaacttgatg atgaagtgtt ttgcaacctt gaagaggaca agtttgaggc agtcaagtct 28560
cttctcttct acgccggacg catgatgtgg ctgacagaga atgcctggat tgatcatccc 28620
caccaggcca gcaccatcgg aatgttgagg acaatcaagc tcgagaacct tgacttgga 28680
acgcacgtct tcgatgtcga tactgtggag aacctagaca ccaaattctt cgttgagcaa 28740
cttttgcgt tcgaggagag cgatgatcag cttttggaat caatacatg gactcatgag 28800
cccgaagtgt actggtgcaa gggtcgtgcc tgggtccctc gtttgaagca ggatattgct 28860
aggaacgacc gtatgaactc gtctcgtcgt ccaattttcg gtaacttta ttcgtccaag 28920
acggccattg cactgaaaga ggcgagggga gcactctcat cgatgtacta tcttgagtca 28980
accgagacgt gtgattcgtt agaagacgct cgtcatgctg gaaaagcaac tgttcgtgtt 29040
cgctacgctc tccccaggc aattcgcgtg ggccatctcg gatactcca tgcgtgcag 29100
ggcagtattc tggagaatac atgtgagggt cctgtagtcg ccttggtga gaagaatgga 29160
tctatactgc atgtaccgag aaactacatg catagtctgc ccgataacat ggcggaaggc 29220
gaggatagtt cttcttgtt gtccacagct gcagccctcc ttgccgaaac aattctctct 29280
agcgctcagt cttttggctc tgatgcacaa attctgatta tggagcccc aattctctgc 29340
gtcaaagcaa ttctggagtc ggccaaaacc tacggtgttc aggttcattt ggcaacaact 29400
ctgtccgacg tcaaaactat tccggtcct tggatccgat tacatgcaa ggaaaccgac 29460
gtcgggtga aacacagcct gccgacaaac atgatggcat tctttgactt gtctaccgac 29520
cggactgctg ccgggataac caaccgttg gccagttgc taccaccag ttgcttcatg 29580
tacagtgggt actatcttat ccgaagtaca gttccacat acaaagttag tcatgttgag 29640
gatattcaa tctcagacga ctctgtggca atggcaaaaa ataccgtctc tgcgtcgact 29700
gtcgacgaca ctgagaaagt tattacagcc acacaaattc tcttgcttg tcagctctct 29760
gtcaaccaca atgaccaacg cttcaatctg gccaccgtca tcgactggaa ggaaaatgag 29820
gtgtccgcta ggatttccc catcgactct ggtaacttat ttccaacaa gaagacgtat 29880
ttgcttggtg gtcttaccgg ggaccttggc cgctctctct gtcgtggat gatcttgcat 29940
ggcgcccgc atgttgtgt cactagccgg aacctcgac ttgatccaa atggatgcc 30000

aacatggagg cacttggtgg tgacatcacc gttctgtcaa tgtaagttga ttgatatcac 30060
atcacacctt gctaccacat cctcgtttac ttatccaatt actttcttta gggatgttgc 30120
caatgaggat tcagtcgatg ctggccttgg caagcttgtc gatatgaagt tgccacctgt 30180
tgccggcatc gcgttcgggc ctttggtgct gcaggatgtc atgctgaaga acatggacca 30240
ccagatgatg gacatggtgt tgaagcccaa ggtacaagga gcacgcattc ttcatgaacg 30300
gttctccgaa cagacgggca gcaaggcgct cgacttcttc atcatgtttt cgtccattgt 30360
tgcagttatt ggcaatcctg gccagtcctaa ctatggcgct gcgaatgcct acctacaggc 30420
tctggcccag caacggtgcg ccagaggatt ggcggtatct tctaccctg aattatcatg 30480
catcgacgtc aagttactaa cgcacaacca cagggatcaa ccatcgatat tgggtccggt 30540
tacggtgtag ggtttgtcac gagggccgag atggaggagg actttgatgc tatccgtttc 30600
atgtttgact cagttgaaga gcatgagctg cacacgcttt tcgccgaagc ggtcgtgtct 30660
gaccagcgtg cccggcagca accacagcgc aagacgggtca ttgacatggc ggaccttgag 30720
cttaccacgg gtatccaga tcttgacct gcgcttcaag atcgaattat ttacttcaac 30780
gacctcggtt tcggaaactt caaaattccc ggtcaacgcg gagacgggtg cgacaatgga 30840
tcagggtcta aaggctccat tgccgaccag ctcaaacaag caacaacttt agaccaagtt 30900
cggcaaateg tgattggtaa gttatctctc atgcgtttcc tgatatcgag ttcaaactaa 30960
caaagttgca gatggtctat ctgagaaact ccgtgttacc ctccaagttt cggacgggga 31020
gagcgtggac ccaaccattc ctctcattga tcaagggtgc gactccttgg gtgcagtgc 31080
tgtcggtca tggttctcaa agcaactcta ccttgacctc ccactcttga gggacttgg 31140
cgggtgcttct gtcgtgatc ttgccgacga cgcggccacc cgactcccag ctacatccat 31200
tccgctgctg ttgcaaattg gtgattccac gggaacctcg gacagcgggg cttctccgac 31260
accaacagac agccatgatg aagcaagctc tgctaccagc acagatgcgt cgtcagccga 31320
agaggatgaa gagcaagagg acgataatga gcaggaggc cgtaagattc ttcgtcgca 31380
gaggttgctc cttggccagg agtattcctg gaggcagcaa caaatggtaa aagatcatac 31440
catcttcaac aacactattg gcatgttcat gaagggtacc attgacctcg accggttgag 31500
gcgggctctg aaagcctcat tgcgcgtca cgagatcttc cgtacgtgct ttgttactgg 31560
cgatgactat agcagcgatt taaatggctc cgtccaagtg gttctcaaga acccgagaa 31620
cagagtgcac tttgttcagg tgaacaacgc tcgggaggca gaggaagagt accggaaact 31680
cgagaagaca aactatagca tctccacagg tgacactctc agactcgttg atttctactg 31740

gggcacagat gaccacctgt tggtaatcgg ctaccacaga ttagttgggtg atggetcaac 31800
aacagaaaaac ctgttcaatg agatcgggca gatttacagc ggggtgaaaa tgcagcgacc 31860
atcgacccaa ttctctgata tagccgtcca acagcgggaa aacctggaaa atgggcgaat 31920
gggggacgat atcgcgttct ggaagtccat gcatagcaaa gtctcgatcat ctgcgccaac 31980
cgtgcttccc atcatgaatc tgatcaatga cctgctgcc aattcagagc agcagcaaat 32040
acagccattc acgtggcagc agtatgaagc aattgctcgt ttagatccca tggcgcctt 32100
ccgaatcaaa gagcggagcc gcaagcacia ggcaaccccc atgcagttct acctggccgc 32160
ctaccacgtt ttgttggcgc gtcttacgg cagcaaagac ataaccatcg gcctcgccga 32220
aaccaaccga tccaccatgg aagaaatttc ggcatgggc ttttctgcta acgtgcttcc 32280
cctgcgcttt gatgagttcg tcggcagcaa gacattcggc gagcaccttg tagccaccaa 32340
ggacagtgtg cgtgaggcca tgcaacacgc gcgggtgccg tatggcgta tctcgactg 32400
tctaggcctg aatctcccta cctcaggcga ggaacccaag actcagacac acgccccctt 32460
gttccaggct gtctttgatt acaagcaggg tcaagcggag agtggctcaa ttggcaatgc 32520
caaatgacg agtgttctcg ctccccgtga gcgcactcct tatgacatcg ttctcgagat 32580
gtgggatgac cctaccaagg acccactcat tcatgtcaaa cttcagagct cgctgtatgg 32640
ccctgagcac gctcaggcct ttgtagacca ctttcttca atcctcacta tgttctcgat 32700
gaacccggct ctgaagttgg cctagatcgt tcagcgccgt gaattcagat gtgtggtttg 32760
agtgttgctc atgataaaga tggattagaa attggcaata gagcagatgg caaatctatc 32820
ctgaattcgg cgtcaattga cacacgcata ttcatctaca aatagcgaat tegtcttgta 32880
tctttgtcaa aattacttct accttcgttg ctcttcttta ttgcagcaat cgtaacatca 32940
agttagatag cgcggttcag agtacgtaa cggtgataaa tatacctcgg tagcgcgttt 33000
cgaaagactc tgtgaggaag gtgaaacctc caaggcttgg aattgatttc aatccatcct 33060
gtatataaat tcgacgccat tgcaaatagt tccatagtta ctggtttagt gcctgttgt 33120
ggatgatcag tggttttaga tgtctgtcat gcctgttcag aacgagcctt ccatgatcta 33180
tccaaaatat gttcacgaaa tatttatgag atggtcgca ccaactataac taaatcacc 33240
ttggaagggt agcattcaaa ccgtgtaaga ttagaactat tcaaatgtt tcagtaaaaa 33300
tgtggtatgg actaggcatg agagccagag cttgtctata taccctgttg tctcacctag 33360
acaaatgaac ctgacatctt gaccttttga tatagctgtt ggaagcgctt gaccgtctcc 33420
tggacatcac tcggtctgtt gggaaaatta tgctttccct gaaactcgag tacatctgca 33480

ttctgaggca ggtaatgtgt ttcaaccatc tgtctcgacc cttggagagc aaaatcttga 33540
cgaccgtgaa gatgcagtgt cggcacgttg attattagct tgtcgtcgtc gtcttgcgcc 33600
tcggctctca tgtaatctct ggcttcacgc ctatagaaac agcaaataca aacagcaatg 33660
ctcattttcg gaaacatgg cagttttccc atttgctgtt gatggagcag caaagtggcg 33720
accaatgcgc cctcagagaa ggccactatg ccgacaatgg gtgcctgtgg gttagttata 33780
gaccaatctt ggacggtctt ttgcacaggc ccgatcacag ccgctactct atcgcccacc 33840
gtgggggttg tcgtgtttgt aacggcgta tgatgctttt ggaaccaggt gtagtatgga 33900
cccatgcctt ggaagacagg aagcacgccg ggtccggggc tggagctaaa cggcgcggtc 33960
gcatatacga attcaaactc gtttttcaac gccacgcgca gtttagagat ctggacgcgg 34020
aatatggctg ctgagcacc cggcacgttg atgcataaga gagcttttct cggtttgcct 34080
ggcgagaaat ctgtaatcct cgtggactc attttctctt gtggtgtgag ctgtgacttc 34140
gtctgttctg gggaatttgt tagtcattac tgacaaggaa ataacaacga cgtagtattg 34200
atc 34203

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (9)

<223> i

<400> 3

gayacngcnt gyasttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer
which has a DNA sequence deduced from the amino
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (8)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (15)

<223> i

<400> 4

tencenknrc wgtgncc

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 5

gcatgttcaa tttgtctc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Penicillium citrinum

<400> 6

ctggatcaga cttttctgc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

gtcgcagtag catgggcc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 8

gtcagagtga tgctcttctc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 9

gttgagagga ttgtgagggc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 10

ttgcttgtgt tggattgtc

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 11

catggtactc tcgcccgttc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 12

ctccccagta cgtaagctc

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 13

ccataatgag tgtgactgtt c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 14

gaacatctgc atccccgtc

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 15

ggaaggcaaa gaaagtgtac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 16

agattcattg ctgttgcat c

21

<210> 17

<211> 722

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 17

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gggggggggg gcttggtcgc tcagagattc 60

aactctgcga ttctgtttaa tcccaatcct atcgcccaaa aacagatca gcagttatgg 120

atcaagccaa ctatccaaac gagccaattg tggtagtggg aagcggttgt cggtttccag 180
gtgggtgtcaa cacaccatca aaactttggg agctgtcaa agagccccgg gatgtacaga 240
ccaagatccc taaggagaga ttgacgtcg atacattta cagccccgat ggcactcacc 300
ccgggcgcac gaacgcaccc ttgcatact tgctgcagga ggatctacgc ggttttgatg 360
cctctttctt caacatccaa gctggagagg ccgaaacgat tgaccacag caaaggctgc 420
tgctggagac ggtctatgaa gctgtatcca acgcaggcct acggatccaa ggccttcaag 480
gatcctctac tgctgtgtac gtcggatga tgacgatga ctatgagact atcgtgacgc 540
gtgaattgga tagtattcct acatactctg ccacgggggt agctgtcagt gtggcctcca 600
accgtgtatc atacttcttc gactggcatg ggccgagtat gacgatcgac acagcctgta 660
gttcatectt agctgccgtg catctggccg tccaacagct tagaacgggc gagagtacca 720
tg 722

<210> 18

<211> 760

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 18

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gggggggggg gactatcaac ggttttatca 60
ccagggcgac tgatatatca gtcaatgaaa caacgttga atgaacaata cccccgccgt 120
aaccgcaacc gcaaccgcaa ccgcaaccgc aaccgcaatg gcaggctcgg cttgtcttaa 180
cacatccacg ccatttgcca tagttggaat gggatgtcga ttgtctggag atgcaacgag 240
tccacagaag ctttgggaaa tggttgaaag aggaggcagt gcctgggtcta aggtccctc 300
ctcgcgattc aatgtgagag gagtatacca cccgaatggc gaaagggtcg ggtccacca 360
cgtaaagggt ggacattca tcgacgagga tctgtctta ttgacgccg cgttcttcaa 420
catgaccaca gaggtcgcca gctgcatgga tccgcagtat cggcttatgc ttgagggtgt 480
ctacgaatcg ctggagagtg ccggtatcac catcgatggt atggcaggct ctaatacgtc 540
ggtgtttggg ggtgtcatgt accacgacta tcaggattcg ctcaatcgtg accccgagac 600
agttccgcgt tatttcataa ctggcaactc aggaacaatg ctttcgaacc ggatatcaca 660

cttctacgac ttacgtggtc ccagcgtgac ggttgacacg gcctgttcga cgacattgac 720
cgcactgcac ttggcgtgcc agagcttacg tactggggag 760

<210> 19

<211> 773

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 19

ggccaogcgt cgactagtagt gggggggggg ggtttttttt ttttcaaggt tgactggaag 60
agtgtctctcg gccacaaat cccagaagca ttagtgctgt tattcgatta taaaccgtcg 120
cagcgtcttc attcttcgct ctttcttctt ttccactggg gtgcataggt cctatctgtc 180
tcacgcaatg ctgggccagg ttcttctgac cgtcgaatcg taccaatggg tatcgacccc 240
tcaagccctt gtggcggtcg cagtgttct tagtctcatc gcctaccgtt tgcgggggag 300
ccagtccgaa ctgcaagtct ataatcccaa aaaatgggtg gagttgacga ccatgagggc 360
taggcaggac ttcgatacgt atgggtccgag ctggatcgaa gcttggttct cgaaaaacga 420
caagccctg cgttccattg ttgattccgg ctattgcacc atcctcccat cgtccatggc 480
cgacgagttt cggaatatca aagatatgtg catgtacaag tttttggcgg atgactttca 540
ctctcatctc cctggattcg acgggttcaa ggaaatctgc caggatgcac atcttgtcaa 600
caaagttgtt ttgaaccagt tacaaccca agcccccaag tacacaaagc cattggctac 660
cttgcccgac gctactattg ccaagttgtt cggtaaaagc gaggagtggc aaaccgcacc 720
tgtctattcc aatggattgg accttgtcac acgaacagtc acactcatta tgg 773

<210> 20

<211> 527

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 20

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gtacctagga actgttcagt tgtccctccc 60
aacccttgg gccgaacaac cttcctccaa tctacgacgg cagattatac ctaggcgcct 120
aacgattag gttgctcatt cgattttgga gagactacct agctataggt accactccaa 180
gctgtagcac agacctttca gcatggtcgc ttcgttgcta cctctctgct ttgcggtag 240
ggaatcaatg aatcagcagc accctctacg ctcgggaaat cgggcattga cctccacact 300
ccaatttcta tccaaaacgg cgtgtctaca cccgatccat accgtttgca ccatagctat 360
tctagctagt accacatacg ttggactact caaagacagc ttcttccatg gccccgcaaa 420
cgttgataaa gcagaatggg gctctttggt cgaaggaagt cgaagcttga tcaccggccc 480
acagaatggc tggaagtggc agagcttcca cggggatgca gatgttc 527

<210> 21

<211> 522

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gggggggggg ggatccatca atctgacttc 60
aggctagcgg accttaacga aacaacgaga gcgagatcat tcatacacca aaacacaggt 120
actatagaag cgccgcgcag tagagattca caccgcccct tgaagcaaaa gtcggaagga 180
attgcgcgat gtcagaacct ctacccccta aagaagggga accaaggcca cagaaggaag 240
aaagtcaaaa tgacacgctc gaagcgactg agtccaagtc ccagcacatc acaggcctca 300
agctcggggt ggtggttgct tcagttactt tcgtagcatt tttgatgctc cttgatatgt 360
ccattatcgt cacggcaatc ccacatatca caagcgagtt ccaactctctg aacgatgtag 420
ggtggtacgg cagtgttat cttctggcta actgtgctct ccagcccctg gccggtaaat 480
tgtatacact cttgggcttg aagtacactt tctttgcctt cc 522

<210> 22

<211> 541

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 22

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg ggctcacctc acattatttg atcttaatcc 60
aataattatg tccttgccgc atgcaacgat tccgacgaac ctacgccgtc gcgcgtttcg 120
acgctcatgt gaccgggtgc atgcacaaaa gctcaaatgt accggtagca atgccaattt 180
agtccgtgct cagtgtcaac gttgtcagca agccggatta aggtgtgtgt acagcgaaag 240
gtacccaag cgcaatttac ataaagaagc cgcagctgga actacaagag ccacagaaac 300
ctcacaaccg atgaccgga catcttctac ggtcttctca tcattggcag agactcctcc 360
accttactgc tcaccaccta cgcattattg cacctcggca ctcaaggaaa cattatcaga 420
accatcagcg gcaaccctgc aattctatga tacatcaatc aactttgatg atcccgagtc 480
gtttcccggc ggctggcctc agccaaatac atttcgcgac gatgccaaca gcaatgaatc 540
t 541

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 23

atcataccat cttcaacaac

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 24

gctagaatag gttacaagcc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 25

acattgccag gcacccagac

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 26

caacgccc aa gctgccaatc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 27

gtcttttct actatctacc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 28

ctttcccagc tgctactatc

20

<210> 29

<211> 1524

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 29

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttcaa cgaaggtaga 60
agtaattttg acaaagatac aagacgaatt cgctatttgt agatgaatat gcgtgtgtca 120
attgaagccg aattcaggat agatttgcca tctgctctat tgccaatttc taatccatct 180
ttatcatgaa caacactcaa accacacatc tgaattcacg gcgctgaacg atctaggcca 240
acttcagagc cgggttcacg gagaacatag tgaggattga agaaaagtgg tctacaaagg 300
cctgagcgtg cttagggcca tacagcgagc tctgaagttt gacatgaatg agtgggtcct 360
tggtagggtc atccacatc tcgagaacga tgcataagg agtgcgtca cggaagcga 420
gaacactcgt cattttggca ttgccaattg agccactctc cgcttgaccc tgcttgtaat 480
caaagacagc ctggaacaag ggggcgtgtg tctgagtctt gggttcctcg cctgaggtag 540
ggagattcag gcctagacag tcgaggatga cgccatacgg caccgcgcg tgttgcatgg 600
cctcagcac actgtccttg gtggtacaa ggtgctcgcc gaatgtcttg ctgccgacga 660
actcatcaa ggcagggga agcacgttag cgaaaaagcc catcgccgaa atttcttcca 720
tggtggatcg gttggtttcg gcgaggccga tggttatgtc tttgctgccg gtaagacgcg 780
ccaacaaaac gtggtaggcg gccaggtaga actgcatggg ggttgccttg tgcttgcggc 840
tccgtctttt gattcggaag gcgaccatgg gatctaaacg agcaattgct tcatactgct 900
gccacgtgaa tggtgtatt tgcgtctgct ctgaattggc agcagggtca ttgatcagat 960
tcatgatggg aagcacggtt ggccagatg acgagacttt gctatgcatg gacttcaga 1020
acgcgatatc gtccccatt cgccatttt ccaggttttc ccgctgttgg acggctagat 1080
cagagaattg ggtcgatggt cgctgcattt tcaccccgt gtaaattctgc ccgatctcat 1140

tgaacagggtt ttctgttggt gagccatcac caactaatct gtggtagccg attaccaaca 1200
ggtgggtcatc tgtgccccag tagaaatcaa cgagtctgag agtgtcacct gtggagatgc 1260
tatagtttgt cttctcgagt ttccggtact cttcctctgc ctccgcagcg ttgttcacct 1320
gaacaaagtg cactctgttc tccgggttct tgagaaccac ttggacggga ccattttaat 1380
cgctgctata gtcacgcca gtaacaaagc acgtacggaa gatctcgtga cggcgcaatg 1440
aggctttcag agcccgctc aaccggctga ggtcaatggt acccttcacg aacatgccaa 1500
tagtggtggt gaagatggta tgat 1524

<210> 30

<211> 784

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 30

aactggaaga attcgggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttc tttgttgett 60
ctcagggccca ctgtaatggt atttcaggta tctctattta ctgctatcca gaagtcaggc 120
attaaatagt caggctcagc ccaggctcga ttcagattgg attcaggctt cagaccatgg 180
ccgctatgct ccttcgtact atacctcgt cgagctatac ccgcttgccc agacaaaagg 240
cttcaactgaa cctttcaact taactgcatt tcgccacaac taactcgacg aggccggcga 300
tggtgttacc attcatgagc tcaaagatcg acacatcaac atggatttca gatgtgatcc 360
agtttcgaag ttcaatggcg acgagtgagt ctacgcgcac acctgccagg tttttggacg 420
aggacatgtc gtcttctgcc agaccaaaaca ttgcacacag cttttccgtc attgctttga 480
ggacgataga aatggcctcg tcgtgagagg tgacctgct tagttgggcc cgcacgccat 540
ctggtccttt tttatgcgaa gagacaaagg attggctctgc atgaaggact tggcggtatt 600
taagtccac aaaccgctgt tctgtatcc agtttgcctc ggtccagtga gcaccggggg 660
atgtgttgat tctgttaacc acagctgcgg gaggtgatgg aaattgaggg gaagaacaca 720
ggattgcctt ctccaacaca tccatgacgt ccttttcacg cataggcttg taacctattc 780
tagc 784

<210> 31

<211> 764

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 31

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttcc gaataaaatg 60
cgttttattt tactaaccta ctgcactaat acagcaccta gtttctctgg gacggaaacc 120
attggaataa gcctggggac ggatgcatat ttgttttagt ttgcgtgta tatcttagca 180
ccggtcatga gggagcggga tgctctcgtt gcgccggcgt accatgagct ttgtggttgg 240
atgcatacga acgctaaaag cgtgacggta gtatttgtca tcgtctcctg gtacaggctt 300
cacatcatac tgaatcagta tatgagcgag gagaatcttg atttccttcg aggcgaagaa 360
ccgcccggga caagcgcgtg ggttcagcc gaagccgatg tgatcacctg tggattcttc 420
caattgagcg gtgaaggcct tgtctggatc ctgcgcgatg cgcataaacc ggtagggatc 480
ataattttcg gggttttccc acacatcagg gttgttcatg cggctctcag ccacagcggc 540
caactcgccc ttgggaatga agaggccatt ggatagagtg atgtctctga gagcgggtact 600
gcgcatagtg gcgcactcga ccggtttgat tcgctgcgtc tctttcatgc agctgtcgag 660
gagcttcage ttgaacagag aggcaggcgt ccagccccct tctccgatta cagtgcggat 720
ctcttggcgg agaggctgaa taaggtctgg gtgcctggca atgt 764

<210> 32

<211> 765

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 32

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttctgg aaaaggacca 60
tctctttata tattcttttt ccctactact tgcactgtaa atttcaaaa catataaaca 120
tgagataccc tttctggcgg ttcaactctac cacctgcctg tctcattgca ttgtgctttt 180

gaaaattatg acaataacaa ccaatgagaa aaaatatgat cctcctgcaa tgaatccact 240
ggagggggta cggagcttgg aatgtccta agattccgac ctaatcagcg tcgagccga 300
tcagtagctg cagcactcgg cctcagtga ttgttaggaa cagggactgt cctggttccg 360
cctgacgggg agacacttcg agaaggggct gaagatgccg gggcagaacg gttgtgcgc 420
atgtgcgcct tgaccaggtg accggcggt agggcagcac atagcgagag ctcccagcc 480
aaaacagcgc ttccgatgat gcgcgcaagt tgacgtgcat tctcaccggg agtggtcggg 540
tgtgatccgc ggacaccaag catgtcaagc attgcgcct ggggtccag aatcgtacca 600
ccgcccacg ttccaacctc aatagacggc atggagacag agatttgaag cgatccgca 660
agattgttca tgagagtgat gcagttagcg ctctccacaa cttgcgccg atcctgacct 720
gtggcaatga aaatggctgc cgcaagattg gcagcttggg cgttg 765

<210> 33

<211> 802

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 33

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt ttttttttt tttttataga atctttgaaa 60
tcgacattaa ttaagtatgt ggagattctt tgtggaggca cggtaatgtg tctatctagc 120
aacgcggtca agcatcagtc tcaggcacag cccgggtgtc gtttttggtt gcaatcttcc 180
gccatcccat tccaaaggca aacacaaacg tgcacgccgt agctccact gctaagtaaa 240
aagtatgata aacggcgaga ctgtaagctt ttacaacccc tggaagggtta ttcttctga 300
ccacatctct gaagccagtc gcccctgtg ccgtcacggc ctgcgtgtcg acagtggcg 360
catacttgct caggccagtt ctcaaaccgg acccaaagac aaggtagca aagtcagga 420
agagcgatcc tccaaacgtc tgtccaaaca cggcgagaga aattccgagg gcacctgtt 480
cgggcgaaag cgtgctttgg atggcgatga taggcgtttg catgccacaa ccacgaccga 540
agcccgcgat aaattggtac atgaccatt tcacagttga tgtatggggc tggaagggtg 600
ataccagacc tgcgcctatg gcgacgagaa cagcgtgcc tagggcccaa ggcaaatagt 660
atcctgtctt tccaattgcg aagccagaaa ccatagccat aatgacttgt ccaagaattc 720

caggcaacat gtacacacca ctacgtgtgg gagaaacatc cttcacagcc tggaagtaga 780
tcggtagata gtaggaaaag ac 802

<210> 34

<211> 562

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 34

aactggaaga attcggggcc gcaggaattt tttttttttt ttttttttac taagcaatat 60
tgtgtttctt cgctaattgcg aatatttctt tatagcaacg tcgcaacaca tttatcgtct 120
tccctgaggc ctttggtgac ttgggctctt cgtctccggc ttcgtcactc caaagcacag 180
ataggagacg agaggccggc gttatggttt tattttcagc gcccaaggatt tgccacgatg 240
tgcttggcat atctgatagg actagacgaa tagatgccgc agccccgtgc tctgtgcta 300
tcccaaagc agtctcaatc ccaactcaata gtcgaaggct tacacgcaat gtcgtgcatg 360
cagaagataa ggcgtgcatg aatgggtcga gatgtgaaat gagctcgccg atatgaagat 420
tagagtgaag cgaggggaagt gcttcggctc ttccattgtc atttctagtg gttgagccag 480
accagtacca atccattcgt gtgctttgct tttgtccaca aggttgggct ttcacacct 540
cggatagtag cagctgggaa ag 562

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq, PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kennedy J. et al., "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis", Science (May 1999) Vol.284, pp.1368-1372	1-60
Y	Hendrickson L. et al., "Lovastatin biosynthesis in Aspergillus terreus : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene", Chem. Biol. (June 1999) Vol. 6, No. 7, pp.429-439	1-60
Y	WO, 95-12661, A (Merck & CO INC), 11 May, 1991 (11.05.91), & AU, 9480955, A & EP, 726940, A1 & JP, 9-504436, A & US, 5744350, A & US, 5849541, A	1-60
Y	Serizawa N., "Development of two-step Fermentation-based Production of Pravastatin, a HMG-CoA Reductase", J. Synthe. Organ. chem. (1997) Vol. 55, No.4, pp.334-338	1-60
Y	FUJII, I, "Polyketide Kousei Busshitsu Seigousei Idenshi no Cloning", Research report of Mochida Kinen	1-60

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 November, 2000 (20.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq, PIR

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kennedy, J. et al. "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis" Science (1999, May) 第284巻 p.1368-1372	1-60
Y	Hendrickson, L. et al. "Lovastatin biosynthesis in <i>Aspergillus terreus</i> : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene" Chem. Biol. (1999, Jun.) 第6巻 第7号 p.429-439	1-60

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488